

Thèse de Doctorat

François MOREAU

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université de Nantes
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire*

École doctorale : *Biologie santé*

Discipline : *Biologie*

Spécialité : *Physiologie, Biologie cellulaire et moléculaire*

Unité de recherche : *INSERM UMR 1087/ CNRS UMR 6291 Institut du thorax*

Soutenue le 3 octobre 2017

Rôle de PCSK9 et conséquences des chirurgies bariatriques sur le métabolisme intestinal du cholestérol

JURY

Président du jury:	Gilles LAMBERT , PU, UMR 1188 Université de La Réunion (La réunion)
Rapporteurs :	Mathilde VARRET , CR (HDR), UMR S1048 : Maladies structurelles cardiovasculaires (Paris) Xavier COLLET , DR, Institut des maladies métaboliques et cardiovasculaires (Toulouse)
Examineurs :	Emmanuelle REBOUL , CR, UMR 1062 INSERM/ 1260 INRA (Marseille) Dominique RAINTEAU , MCU, UMR 7203 Laboratoire des biomolécules (Paris)
Directeur de Thèse :	Bertrand CARIOU , PUPH, Service d'endocrinologie et nutrition (Nantes)
Co-directeur de Thèse :	Michel NEUNLIST , DR, Institut des maladies de l'appareil digestif (Nantes)
Co-encadrant de Thèse :	Cédric LE MAY , CR, Institut du thorax (Nantes)

Remerciements

Je tiens, tout d'abord, à remercier les membres de mon jury de thèse. Merci au Dr Mathilde Varret et au Dr Xavier Collet d'avoir accepté d'être mes rapporteurs et d'avoir pris le temps d'examiner mon travail. Je remercie également les Dr Emmanuelle Reboul, Gilles Lambert et Dominique Rainteau d'avoir accepté le rôle d'examineur lors de ma soutenance de thèse. J'ai eu le plaisir de tous vous rencontrer et discuter avec vous à l'occasion de congrès.

Je remercie également les Dr Christophe Guilluy et Olivier Briand d'avoir fait partie de mon comité de thèse.

Je remercie le Pr Hervé Le Marec ainsi que le Dr Richard Redon de m'avoir accueilli au sein de l'institut du thorax.

Bertrand, je te remercie d'avoir été mon directeur de thèse. Malgré un emploi du temps très chargé, tu as su rester disponible. Je remercie également Michel Neunlist d'avoir accepté de co-encadrer cette thèse.

Je remercie tout particulièrement le Dr Cédric Le May. Cédric, tu m'as accueilli dès la licence 3, j'ai donc passé près de 7 ans à tes côtés. Tu m'as initié au broyage de fèces, à l'amour des produits Apple et au goût subtil du coca zéro. Tu as surtout éveillé mon intérêt pour la recherche fondamentale et je t'en serai éternellement reconnaissant.

Xavier, tu as été un réel support moral pendant ma thèse. Malgré ton petit grain de folie tu es vraiment quelqu'un d'attachant. Tu as été plus qu'un collègue et tu vas énormément me manquer. Ne t'inquiètes pas cependant, j'ai confié ta garde à Gilliane qui sera chargée à présent de s'occuper de ton goûter.

Gilliane, j'ai réalisé avec toi, il y a 9 ans au cours d'un stage en L1, ma toute première expérience scientifique. Tu as été d'une grande aide au cours de mes deux dernières années de thèse. La boucle est ainsi bouclée. Je te remercie pour l'aide que tu m'as apporté et pour avoir été une super voisine de bureau.

Je tenais également à remercier Laurianne Van Landeghem et Mélissa Touvron pour leur travail sur les isollements d'entérocytes murins qui a permis d'enrichir cette étude.

Claire, tu es à l'origine d'une partie de ce travail. Travailler à tes côtés m'a beaucoup stimulé lors de ma première année de thèse et je t'en remercie.

Audrey, ça a été un plaisir de te connaître et de travailler avec toi. Je te remercie pour l'aide que tu m'as apporté sur les différents projets sur lesquels on a travaillé ensemble. Je garderai longtemps en mémoire notre voyage catastrophique à Montréal :)

Damien, malgré nos tempéraments très différents, je trouve que l'on s'est pas trop mal démerdé! Je te souhaite de faire une belle thèse pleine de publications.

Wieneke, j'avais eu la chance de te rencontrer il y a quelques années, j'ai donc été ravi quand j'ai appris que tu venais rejoindre les rangs de l'équipe. Je te remercie pour tes conseils et ta bonne humeur communicative.

Merci également à vous deux Laurence et Fred d'avoir participé à l'un de mes projets et d'avoir partagé quelques soirées.

Un grand merci à tout les membres qui participent à l'ambiance et à l'énergie de l'équipe IV, Bertrand, Cédric, Xavier, Karim, les deux Matthieu, Gilliane, Lucie, Wieneke, Claire, Audrey, Damien, Meryl, Jocelyne, Amandine, Aurélie.

Je remercie également mes deux relectrices Nadjat et Jocelyne. Merci d'avoir pris un peu de votre temps pour réduire de façon significative le nombre de fautes dans cet exemplaire.

Lucile, on a partagé deux très bonnes années communes en tant que thésards. je me souviendrai longtemps de nos conversations passionnantes de 18h30 sur nos plan B de carrières, qui m'ont un peu manqué après ton départ pour la Suède.

Clara, bien que tu ne sois restée qu'un an j'ai adoré les super moments que l'on a partagé. Tu es, je pense, la personne la plus NSFW que je connaisse (après moi). Notre culture littéraire commune (Brain, Vice) ainsi que l'amour du b****e nous ont beaucoup rapprochés....

...C'est donc peut être une bonne chose que ça n'ait pas duré trop trop longtemps! Je pense que tu mérites largement un petit : "b****e sur Clara"

PS : pense à moi pour un petit poste d'attaché parlementaire quand tu dirigeras la Bretagne.

Pauline, je ne compte même plus tout les moments comico-tragiques que l'on a passé ensemble et qui sont impossibles à énumérer ici. Tu fais partie des personnes dont l'amitié compte énormément pour moi. J'ai beaucoup d'admiration pour le self-control dont tu as fait preuve tout au long de ta thèse (exception faite de ton fail capillaire).

Nadjet, tu as été ma « partner of crime » tout au long de cette dernière année. On a partagé beaucoup de choses au cours de cette année, un peu trop même (preuve en est que mon téléphone et mon portable se connectent automatiquement à ton wifi quand je squatte ton appart). Je t'ai imposé mes goûts cinématographiques (un peu atypiques) et toi ton caractère (un peu atypique aussi)... On est kit !

Merci à vous quatre les filles ! Sans vous ma thèse aurait été beaucoup moins drôle.

Pauline Paupiette je suis tellement content de t'avoir rencontré ne serait ce que pour me faire prendre conscience qu'il existait des personnes qui possèdent un karma encore plus pourri que le mien.

Meryl, ça a été un plaisir de te connaître et de travailler avec toi. Je garde de très bons souvenirs :) des différents congrès et soirées que nous avons pu faire.

Maud, je te remercie pour tes conseils avisés qui m'ont beaucoup aidé en particulier au début de ma thèse.

Awen, on a fait nos thèses en parallèle mais à distance. En plus de ça, cette année à été riche en bons moments avec ton mariage et notre entrée commune dans la trentaine.

Avant de conclure, je tenais également à remercier tout les membres du labo avec qui j'ai pu partager des verres après une longue journée : Stephan, Nathalie G, Sophie, Karim, Simon, Nathalie V, Agnès C, Marc, Christian, Floriant, Benjamin, Virginie, Maxime, Marine, Nejma, Franck, Florient, Matthieu ainsi que tout ceux que j'ai sûrement oublié lors de l'écriture, un peu à l'arrache, de ces remerciements et qui participent à l'ambiance générale de l'institut.

Merci également à Rémi, Alex et Cris qui me rappellent qu'il y a un monde en dehors du labo.

Je remercie, enfin, ma famille et en particulier ma mère pour la relecture et mon frère, Benjamin, qui m'a énormément aidé pour la mise en page de ce manuscrit et qui s'apprête à connaître, à son tour, les joies de la thèse.

Table des matières

I	Introduction	1
1	Avant-propos	2
2	Rôle des lipides	5
2.1	Place du cholestérol dans la classification des lipides	5
2.2	Structure membranaire	6
2.3	Précurseur des acides biliaires et des hormones stéroïdiennes	6
2.4	Médiateur de voies de signalisation	7
2.5	Source d'énergie	7
3	Généralités sur le métabolisme lipidique	9
4	Rôle majeur du foie dans le métabolisme lipidique	13
4.1	Synthèse de cholestérol	13
4.2	Rôle hépatique dans le métabolisme des acides biliaires	14
4.2.1	Biosynthèse des acides biliaires	14
4.2.2	Rôle des acides biliaires dans le métabolisme lipidique	16
4.3	PCSK9, un régulateur clef du métabolisme du cholestérol	18
4.3.1	Découverte de PCSK9	18
4.3.2	Structure et rôle de PCSK9	20
4.3.3	Régulation de l'expression de PCSK9	28
5	Rôle central de l'intestin dans le métabolisme lipidique	33
5.1	Structure de l'intestin	33
5.2	Digestion des lipides	37
5.3	Micellisation	38
5.4	Absorption intestinale des lipides	39
5.4.1	Absorption intestinale des AG	39
5.4.2	Absorption intestinale du monoacylglycerol	41
5.4.3	Absorption intestinale du cholestérol	42
5.5	Absorption intestinale des acides biliaires	45
5.6	Métabolisme luminal des stérols	47
5.7	Production des chylomicrons	48
5.8	Métabolisme des chylomicrons	50

5.9	Production des HDL	51
5.10	L'Efflux Transintestinal de Cholestérol (TICE)	52
5.11	Dyslipidémies liées à une dérégulation intestinale.	57
5.12	Cibler l'intestin pour lutter contre les dyslipidémies	59
5.12.1	Stratégies pharmacologiques	59
5.12.2	Stratégies chirurgicales	60
5.13	Rôle intestinal de PCSK9	64
II	Publications	66
6	Roux-en-Y gastric by-pass reduces plasma cholesterol in diet-induced obese mice by affecting transintestinal cholesterol excretion and intestinal cholesterol absorption	67
7	Sleeve Gastrectomy Alters Intestinal Permeability in Diet-Induced Obese Mice	101
8	Plasma cholesterol is excreted in the feces of patients with complete common bile duct obstruction	111
9	PCSK9 is not secreted by mature differentiated intestinal cells	120
III	Discussion	154
10	Discussion	155
11	Annexes	165
12	Techniques of Sleeve Gastrectomy and Modified Roux-en-Y Gastric By-pass in Mice	166
12.1	Retrograde cholesterol transport in the human Caco-2/TC7 cell line : a model to study trans-intestinal cholesterol excretion in atherogenic and diabetic dyslipidemia	176
12.2	L'excretion trans- intestinale de cholesterol (TICE) Une nouvelle voie d'épuration du cholesterol plasmatique	186
	Bibliographie	193

Table des figures

2.1	Structure du cholestérol	5
3.1	Représentation schématique d'une lipoprotéine	10
3.2	Représentation des différentes voies du métabolisme lipidique.	11
4.1	Représentation des différentes voies de biosynthèse des acides biliaires . . .	15
4.2	Structure de PCSK9	21
4.3	Maturation et modifications post-traductionnelles de PCSK9	22
4.4	Modification de la N-glycosylation au cours de la maturation de PCSK9 . .	23
4.5	Représentation du mécanisme d'action de PCSK9	24
4.6	Régulateurs de l'expression de PCSK9	30
5.1	Représentation des surfaces des différentes zones du tractus digestif	34
5.2	Schéma des feuilletts composants l'intestin	35
5.3	Représentation des populations cellulaires composant l'épithélium digestif .	37
5.4	Représentation schématique de la prise en charge des lipides par l'entérocyte.	39
5.5	Représentation des voies de synthèse du coprostanol	49
5.6	Acteurs moléculaires impliqués dans le TICE.	54
5.7	Représentation du RYGB et de la Sleeve	62
5.8	Conséquences du RYGB et de la Sleeve sur le métabolisme lipidique. . . .	64
10.1	Conséquences de la fucosylation sur la digestion de la N-glycosylation par la PNGase F.	163

Liste des tableaux

3.1	Tableau regroupant les grandes classes de lipoprotéines	10
-----	---	----

Abbreviations

ABCG5/8	A TP B inding C asette sub-family G member 5/8
AG	A cide G ras
AKR1D1	A ldo K eto R eductase family 1 member D1
ANGPTL3	ANG io P oie T ine L ike 3
Apo A	A polipoprotéine A
APO B	A polipoprotéine B
Apo C	A polipoprotéine C
ASBT	A pical S odium B ile acid T ransporter
ATGL	A dipose T riglyceride L ipase
ATP	A dénosine T ri P hosphate
AVC	A ccident V asculaire C érébral
BSH	B ile S alt H ydrolase
CA	C holique A cid
CCK	C holécystokinine
CDCA	C heno D eoxy C holique A cid
CETP	C holesteryl e ster T ransf e t P rotein
CREBH	C yclic A MP- R esponsive E lement B inding protein 3-like 3, H epatocyte specific
CV	C ardio V asculaire
CYP7A1	C ytochrome P 450 7A1
CYP27A1	C ytochrome P 450 27A1
CYP36A1	C ytochrome P 450 36A1
CYP46A1	C ytochrome P 450 46A1
CYP7B1	C ytochrome P 450 7B1
CYP8B1	C ytochrome P 450 8B1
DCA	D eoxy C holique A cid
DHCR7	D ehydro C holesterol R eductase 7
DPP-4	D ipeptidyl P eptidase- 4
DT2	D iabète de T ype 2
Endo-H	E ndoglycosidase H
I/L-FABP	I ntestin/ L iver- F atty A cid B inding P rotein
FAM20c	F amily with sequence similarity 20 , member C
FATP4	F atty A cid T ransport P rotein 4
FGF 15/19	F ibroblast G rowth F actor 15/19
FXR	F arnesoid X R eceptor

Abbreviations

GC-MS	Gas Chromatography Mass Spectrometry
GLP1/2	Glucagon Like Peptid 1/2
HDL	High Density Lipoprotein
HBL	HypoBetaLipoproteinemia
HMGCOA-R	Hydroxy Méthyl Glutaryl COA
HMGCOA-R	Hydroxy Méthyl Glutaryl COA Réductase
HSDH	Hhydroxy Steroid DeHidrogenase
HSL	Hormone Sensitive Lipase
IBABP	Ileale Bile Acid Binding Protein
IDL	Intermediate Density Lipoprotein
IEF	Iso Electric Focussing
a/r ISC	Active/Reserve Intestinal stem Cell
Kda	Kilo dalton
KO	Knock Out
LCA	Litocholique Acid
LCAT	Lécitine Cholestérol Acyl Transférase
LC-MS	Liquid Chromatography Mass Spectrometry
LDL	Low Density Lipoprotein
LIMP2	Lysosome Membrane Protein 2
Lp(a)	Lipoprotein (a)
LPL	LipoProtein Lipase
LPS	LipoPolySaccharide
MG	Monoacylglycerol
MGAT	Monoacylglycerol AcylTransferase
MGL	Monoacylglycerol Lipase
MLN64	Metastatic Lymph Node 64
MTP	Microsomal Transport Protein
NARC1	NeuralApoptosis Regulated Convertase 1
NIH	NationalInstitutes of Health
NPC1	Niemann Pick disease type C1
NPC1L1	Niemann Pick C1-Like 1
OATP	Organic Anion Transporting Polypeptide
ORP1L	Oxysterol-binding protein Related Protein 1L
OSTalpha	Organic Solute Transporter alpha

Abbreviations

PC	Pro protein C onvertase
PCSK9	Pro protein C onvertase S ubtilisin K exin type 9
PCTV	Pre Chylomicron T ransport V esicle
PLA2	Phos pho L ipase A2
PPAR	P eroxisome P roliferator- A ctivated R eceptors
PYY	P eptid YY
RE	R eticulum E ndoplasmique
RCT	R everse C holesterol T ransport
RYGB	R oux en Y G astric B ypass
SLO	S mith- L emli- O ptiz syndrom
SRB1	S cavenger R eceptor class B member 1
SREBP2	S terol R egulatory E lement B inding P rotein 2
TG	T ry G licéride
TICE	T rans I ntestinal C holesterol E xcretion
UDCA	U rso D eoxy C holique A cid
VLDL	V ery L ow D ensity L ipoprotein

PREMIÈRE PARTIE

Introduction

Avant-propos

Le lien étroit de causalité entre l'hypercholestérolémie et les maladies cardiovasculaires n'est plus à débattre. Une méta-analyse sur 900 000 patients estime qu'une réduction de la cholestérolémie à une concentration de 1,5 mmol/l (soit 0,58g/l) diminue d'un-tiers le risque de survenue d'une cardiopathie ischémique et d'un accident vasculaire cérébral (AVC), indépendamment de l'âge, de la tension artérielle et des niveaux de lipides plasmatiques de départ [1]. L'hypercholestérolémie fait partie des troubles lipidiques aussi appelés dyslipidémies qui sont réparties en plusieurs classes selon leur nature. L'hypercholestérolémie pure, caractérisée par des niveaux circulants de cholestérol $\geq 2,4$ g/l et des niveaux de triglycérides (TG) < 2 g/l, constitue la dyslipidémie la plus fréquente et concerne 30% de la population générale. La seconde dyslipidémie, dont la prévalence touche 12% de la population, se définit par des niveaux réduits de HDL (High density lipoprotein) cholestérol : $< 0,4$ g/l chez l'homme et $< 0,5$ g/l chez la femme associés à des concentrations importantes de TG. On retrouve, ensuite, les hyperlipémies mixtes définies par un cholestérol total $\geq 2,4$ g/l et des TG ≥ 2 g/l qui sont retrouvées dans 5% de la population. Enfin, les hypertriglycéridémies pures, retrouvées dans 4% de la population, sont caractérisées par des niveaux de TG ≥ 2 g/l et des niveaux circulants de cholestérol $\geq 2,4$ g/l [2]. La relation entre les niveaux circulants de LDL (Low Density Lipoprotein) cholestérol et les risques cardiovasculaires a été établie dans de nombreuses études, faisant du LDL cholestérol une cible thérapeutique afin de lutter contre les maladies cardiovasculaires (CV).

Le développement des thérapies visant à réduire les niveaux circulants de LDL cholestérol a cependant levé un nouveau débat autour d'une question : Existe-il un seuil minimum à ne pas dépasser ? [3]. Le cholestérol est un composé essentiel du vivant, bien qu'il ait été démontré, dans un très grand nombre d'études, les bénéfices d'une baisse des niveaux

de LDL cholestérol sur la survenue de maladies CV. Son implication dans de nombreux mécanismes a donc suscité quelques inquiétudes quant aux conséquences d'une forte diminution. En regard de son rôle de précurseur dans la biosynthèse des acides biliaires, la déplétion en cholestérol pourrait impacter la production des acides biliaires et donc certaines fonctions régulées par ces derniers. Cependant, chez des patients présentant des niveaux faibles de cholestérol, la synthèse d'acides biliaires n'est pas altérée [4] [5]. Une baisse de la production d'acides biliaires a, en revanche, été obtenue après aphérèse et dans un contexte où la synthèse d'acides biliaires avait été préalablement augmentée [6]. Des études sur des patients, sous traitement provoquant une baisse de la cholestérolémie, n'ont pas non plus montré d'altérations de la synthèse des hormones stéroïdiennes [7] [8].

L'abondance de cholestérol dans le cerveau a conduit de nombreuses études à identifier les conséquences d'une diminution du cholestérol sur les fonctions cérébrales. Le cerveau contient 25% de la quantité totale de cholestérol de l'organisme [9]. Cependant, la barrière hémato-encéphalique permet d'isoler le cholestérol cérébral de celui du reste de l'organisme. Ainsi, des variations des niveaux circulants de cholestérol n'affectent pas ceux du cerveau [10]. De plus, aucune corrélation n'a été établie entre la réduction de la cholestérolémie et la survenue d'épisodes dépressifs ou de suicides [11] [12]

Le risque de développer un diabète, suite une diminution des niveaux de cholestérol, a également été suggéré [13]. En effet, des patients présentant des niveaux bas de cholestérol suite à la présence d'une mutation génétique ou d'un traitement par statines ont une prévalence augmentée de développer un diabète [14] [15]. À l'inverse, les patients atteints d'hypercholestérolémie familiale sont moins nombreux à développer un diabète [16]. Sur un court terme, un traitement hypocholestérolémiant, consistant à bloquer l'action de la proprotéine convertase subtilisine/kexine de type 9 (PCSK9) à l'aide d'anticorps, n'augmente pas l'incidence de développer un diabète [17]. Il est important de noter que, dans de nombreux cas, les diabétiques présentent un profil lipidique caractérisé par une baisse du cholestérol HDL et non du LDLc [3]. Plusieurs études se sont penchées sur les mécanismes reliant les niveaux de cholestérol et le développement du diabète. En effet, le rôle central du cholestérol a conduit les cellules à développer un mécanisme complexe de régulation de la synthèse de cholestérol [18]. Ainsi, une réduction de la synthèse de cholestérol provoque une augmentation de l'expression du récepteur au LDL (LDLR) afin de compenser cette baisse. Dans les cellules beta des îlots de Langerhans, l'internalisation de cholestérol suite

au recrutement des LDLR interférerait avec la sécrétion d'insuline [19] [20].

Plusieurs travaux suggèrent que l'hypocholestérolémie fragilise le système immunitaire et favorise les infections [21] [22]. Cependant, des patients hypocholestérolémiques ont un meilleur pronostic vital [23]. De même, des souris sous inhibiteur de PCSK9 ont un meilleur taux de survie dans un contexte de septicémie. À l'heure actuelle, malgré un nombre important d'études, aucune d'entre elles n'apporte une preuve directe d'effets délétères d'une baisse des niveaux de cholestérol surpassant le rapport bénéfice risque.

L'axe thématique sur lequel repose les différents projets auquel j'ai pris part consiste à mieux caractériser le rôle de l'intestin dans le métabolisme du cholestérol.

Nous nous sommes focalisés, dans un premier temps, sur une nouvelle voie d'élimination du cholestérol : la voie trans-intestinale d'excrétion du cholestérol (TICE). Le premier projet a, ainsi, consisté à évaluer les conséquences des chirurgies bariatriques (la sleeve et le bypass) sur le métabolisme du cholestérol et en particulier sur le TICE. Ce travail a été réalisé en collaboration avec Claire Blanchard, chirurgienne viscérale, dont le rôle a été de mettre en place et de gérer tous les aspects du projet en lien avec les chirurgies. Ma contribution principale à ce travail a reposé sur le développement et la mise en place de méthodes de mesure des acides biliaires et des flux de cholestérol en chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS).

En lien étroit avec ce projet, nous avons ensuite souhaité déterminer les conséquences de la sleeve sur les différentes fonctions intestinales telles que la perméabilité para et trans-cellulaire ou le transit.

L'étude du TICE a essentiellement été réalisée chez l'animal, en particulier chez la souris. Ce constat a motivé un troisième projet consistant à apporter une preuve *in vivo* de l'existence du TICE chez l'homme. Ceci a été rendu possible par l'utilisation d'un traceur stable du cholestérol, dosé en GC-MS

Enfin, le dernier projet vise à mieux caractériser la forme intestinale de PCSK9. PCSK9 est un acteur clef du métabolisme du cholestérol. Cependant, une majorité d'études se sont focalisées sur la forme hépatique de PCSK9. Cette étude s'est intéressée à la forme intestinale et plus particulièrement sur la capacité de l'intestin à la sécréter.

Rôle des lipides

2.1 Place du cholestérol dans la classification des lipides

Dans le but de favoriser et de faciliter les échanges internationaux autour des lipides, le comité international de classification et de nomenclature des lipides en association avec le consortium LIPID MAPS a réalisé une classification des différents lipides en 2005 puis qui a été mise à jour en 2009 [24] [25]. Ils définissent ainsi 8 classes de lipides : les acyles gras, les glycérolipides, les glycérophospholipides, les sphingolipides, les stérols, les prénoles, les saccharolipides et les polyketides. Le cholestérol appartient à la classe des stérols.

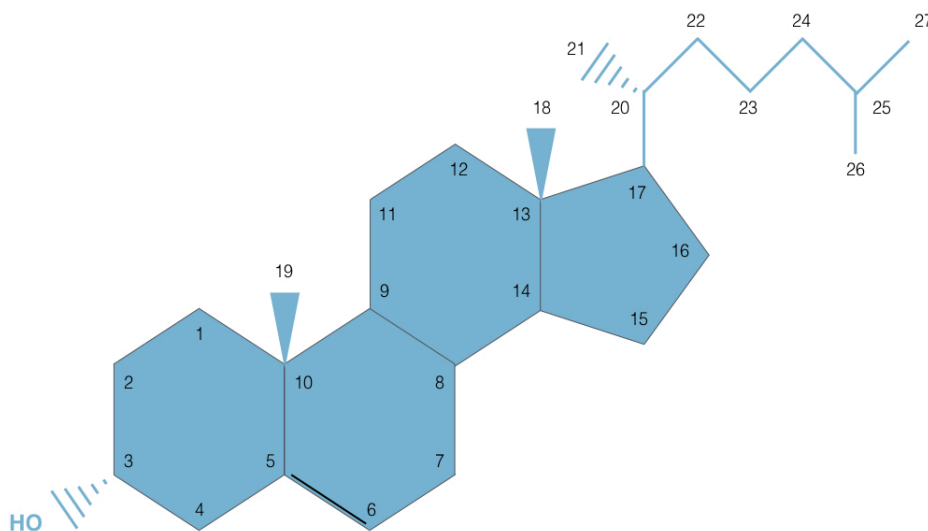


FIGURE 2.1 – Structure du cholestérol

Le cholestérol est une molécule amphiphile composée de 4 cycles carbonés constituant

le noyau stérane (figure 2.1). Une queue hydrocarbonée apolaire est liée au noyau stérane par le carbone 17. Enfin, un groupement hydroxyle, localisé sur le carbone 3, constitue la partie polaire et hydrophile du cholestérol. L'estérification du groupement hydroxyle, nécessaire à la conversion du cholestérol libre en ester de cholestérol, rend ce dernier totalement hydrophobe.

2.2 Structure membranaire

La membrane cellulaire se présente sous la forme d'une bicouche lipidique composée principalement de phospholipides et de cholestérol, qui constituent 50% du poids total de la membrane cellulaire [26]. En plus d'un rôle structural, les lipides membranaires participent à la formation de sous compartiments impliqués dans différentes fonctions cellulaires telles que l'endocytose ou la transmission de signaux [27] [28]. Enfin, la diversité lipidique de la membrane cellulaire lui confère son intégrité face à des changements locaux de pH et d'osmolarité [29].

2.3 Précurseur des acides biliaires et des hormones stéroïdiennes

Le cholestérol constitue le précurseur de nombreuses molécules telles que les acides biliaires et les hormones stéroïdiennes. La production des acides biliaires est réalisée dans le foie sous l'action d'une série d'enzymes dont CYP7A1, CYP8B1 et CYP27A1. La biosynthèse des acides biliaires sera détaillée dans un chapitre suivant (page 14). La synthèse des hormones stéroïdiennes a lieu dans les glandes surrénales (cortisol, aldostérone et androgène) et dans les gonades et le placenta (testostérone, œstrogène et progestérone). Le cholestérol est le substrat commun à toutes les hormones stéroïdiennes. Le cholestérol, sous l'action d'une série d'enzymes appartenant à la famille du cytochrome P450 et à celle de la hydroxysteroid dehydrogénase, va subir un raccourcissement de sa chaîne carbonée en position C17 et une hydroxylation de son noyau stéroïde [30]. Contrairement à la croyance populaire, le cholestérol n'est pas un précurseur de la vitamine D. Cette méprise vient de l'existence d'un précurseur commun au cholestérol et à la vitamine D : le 7 déhydrocholestérol. La conversion du 7 déhydrocholestérol par la 7 déhydrocholestérol

réductase (DHCR7) constitue la dernière étape de synthèse du cholestérol. Une mutation sur la DHCR7, à l'origine du syndrome de Smith-Lemli-Opitz (SLO), provoque ainsi une accumulation du précurseur du cholestérol entraînant divers troubles congénitaux, un retard mental et un retard de croissance [31]. En revanche, sous l'effet des ultraviolets B, le 7 déhydrocholesterol est converti en vitamine D3 puis en vitamine D [32].

2.4 Médiateur de voies de signalisation

Les lipides ne sont pas seulement des constituants passifs de la membrane cellulaire, mais vont également jouer un rôle de médiateurs dans la transmission de signaux. Ce rôle a été suggéré dans les années 50 par les travaux de Hokin et Hokin montrant le rapide renouvellement des stocks de phospholipides inositol après stimulation des cellules du pancréas par l'acétylcholine [33]. Quarante années plus tard, Nishizuka Y identifie le rôle du diacylglycerol et de l'inositol triphosphate dans l'activation de la protéine kinase C et dans l'enrichissement intracellulaire en calcium [34]. Depuis, de nombreux travaux ont mis à jour l'implication des lipides membranaires dans les grandes fonctions cellulaires telles que l'apoptose [35], le cycle cellulaire, la migration [36], la prolifération, et l'inflammation [37] [38].

2.5 Source d'énergie

Contrairement aux triglycérides, le cholestérol ne peut être utilisé comme une source d'énergie. Ainsi, les triglycérides sont la principale source d'énergie de l'organisme [39]. Pour une quantité équivalente, les TG produisent 6 fois plus d'énergie que le glycogène [39]. Il existe 2 sources de TG : les TG alimentaires nouvellement absorbés et localisés sous la forme de lipoprotéines circulantes et les TG stockés dans les adipocytes. Ainsi, en réponse à une demande énergétique, les stocks de TG sont mobilisés. Les TG sont localisés dans la circulation sous forme de lipoprotéines/chylomicrons et stockés au niveau du tissu adipeux. Afin d'être utilisés pour générer de l'adénosine triphosphate (ATP), une conversion des TG en acides gras est nécessaire. Quatre enzymes sont responsables de l'hydrolyse des TG en acide gras : la triglycéride lipase adipocytaire (ATGL), la lipase hormonosensible (HSL), la lipoprotéine lipase (LPL) et la monoacylglycérol lipase (MGL). L'expression d'ATGL et de l'HSL est augmentée par le jeûne et réduite par l'insuline.

L'oxydation des acides gras est majoritairement réalisée au sein de la mitochondrie [40]. Au sein de la mitochondrie, les acides gras sont dans un premier temps convertis en acyl-CoA par l'acyl-coA synthétase [41]. Selon la taille des acides gras cette conversion a lieu dans la matrice mitochondriale ou dans le cytosol pour les acides gras à chaînes longues. Les acides gras à chaînes longues nécessitent de s'associer à la carnitine pour atteindre la matrice mitochondriale [42]. La beta oxydation des acides gras se compose de 4 étapes pour parvenir à la production de l'acetyl-CoA. La dégradation de l'acetyl-CoA par le cycle de krebs puis par la phosphorylation oxydative induit la production d'ATP.

Généralités sur le métabolisme lipidique

Le transport plasmatique des lipides hydrophobes nécessite la formation d'un complexe lipide-protéine appelé lipoprotéine. Nous devons la découverte des lipoprotéines à Michel Macheboeuf, scientifique français, qui en 1929 décrit une protéine riche en lipides, isolée à partir du sérum de cheval, que l'on appellera plus tard HDL. L'avènement de l'ultracentrifugation, inventée par le chimiste suédois Theodor Svedberg, et les travaux des groupes de John W Gofman à Berkeley et d'un groupe du National institutes of health (NIH) composé par J H Bragdon, Howard Eder et Richard Havel, ont permis d'isoler et d'identifier 7 catégories de lipoprotéines : les chylomicrons, les chylomicrons résiduels, les lipoprotéines de très haute densité (VLDL), les lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL), les LDL, les HDL et la lipoprotéine (a) (Lp(a))[43][44].

Les lipoprotéines sont des structures sphériques organisées en deux compartiments (figure 3.1). Le compartiment central, hydrophobe, est composé de lipides non polaires tels que le cholestérol ester et les triglycérides. La membrane extérieure, hydrophile, contient du cholestérol libre et des phospholipides. Le groupement hydroxyle du cholestérol libre lui confère son caractère amphiphile lui permettant ainsi d'être à la surface des lipoprotéines. Enfin, des apolipoprotéines (APO), localisées au sein de la membrane, constituent la part de protéines des lipoprotéines. Chaque lipoprotéine se caractérise par une combinaison différente d'apolipoprotéines et des concentrations variables en cholestérol, TG et PL (résumé dans le tableau 3.1)

Les chylomicrons, sécrétés par l'intestin, ont pour fonction de distribuer le cholestérol et les triglycérides alimentaires aux tissus périphériques et au foie (figure 3.2). Les chylomicrons, dont le diamètre peut atteindre 1,2 μm , constituent la classe de lipoprotéines la plus large. Sa taille est variable et dépend de la teneur en lipides de l'alimentation.

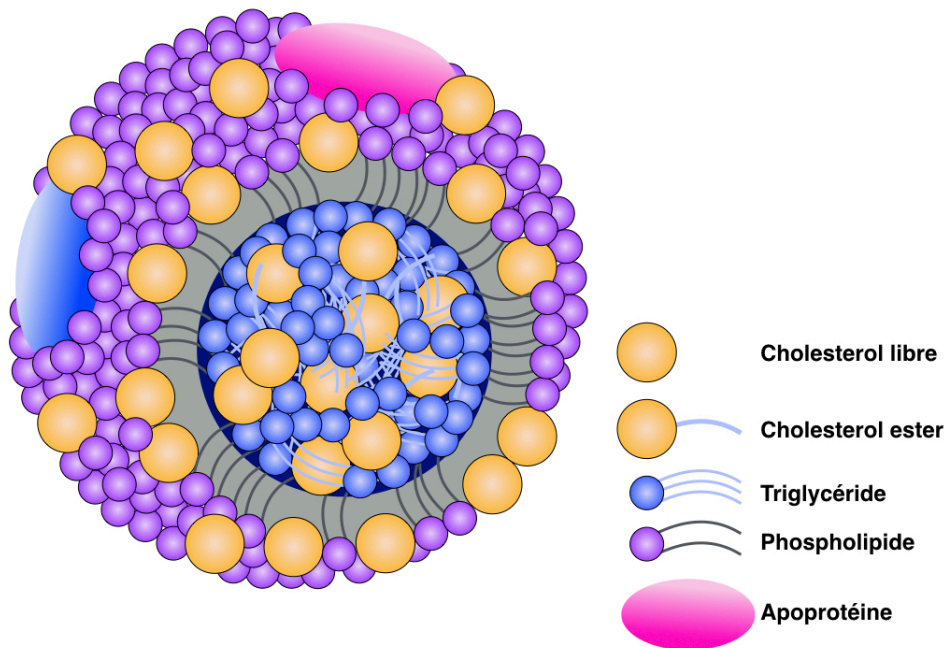


FIGURE 3.1 – Représentation schématique d'une lipoprotéine

TABLE 3.1 – Tableau regroupant les grandes classes de lipoprotéines

	Densité (g/ml)	Diamètre (nm)	Protéine %	Composition protéique	Lipides %
Chylomicron	<0,95	>75	1	ApoB48, ApoA1, ApoA4, ApoE	TG 88% Chol 4% PL 7%
VLDL	0,95-1,006	30-80	8	ApoB100, ApoC1, ApoC2, ApoC3, ApoE	TG 54% Chol 22% PL 16%
LDL	1,019-1,063	18-25	21	ApoB100, ApoC3, ApoE	TG 11% Chol 46% PL 22%
Lp(a)	1,05-1,12	25	36	ApoB100, ApoA	TG 9% Chol 37% PL 18%
HDL	1,063-1,210	5-12	50	ApoA1, ApoA2, ApoC1, ApoC2, ApoC3, ApoD, ApoE	TG 4% Chol 20% PL 26%

Ainsi, une alimentation riche en triglycérides génère la production de larges chylomicrons [45]. Le catabolisme des chylomicrons par la LPL conduit à la formation des chylomicrons résiduels. Ces particules, dont la taille est diminuée de 15 à 40 fois, sont majoritairement constituées de cholestérol, les rendant ainsi pro-athérogéniques [46].

Les VLDL, pour Very Low Density Lipoprotein, représentent la classe de lipoprotéines de faible densité dont le rôle est de distribuer les TG et le cholestérol endogène aux tissus périphériques. Les VLDL sont produites par le foie et leur taille, de façon similaire au chylomicrons, varie en fonction de la production hépatique en TG. Au cours du catabolisme des VLDL, par l'action de la LPL, les particules s'enrichissent en cholestérol. Cette réaction, qui produira à terme les LDL, conduit à la formation de lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL).

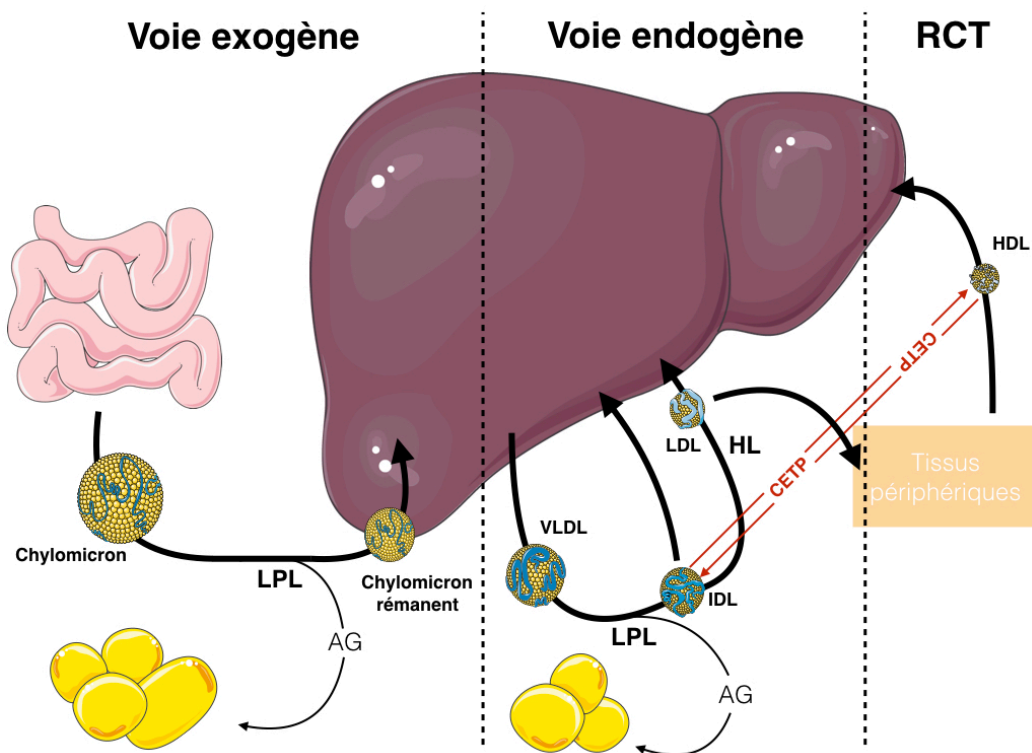


FIGURE 3.2 – Représentation des différentes voies du métabolisme lipidique. Lipoprotein lipase, LPL ; Hepatic lipase, HL ; Acides gras, AG ; Very low density lipoprotein, VLDL ; Intermediate density lipoprotein, IDL ; Low density lipoprotein, LDL ; Cholesteryl ester transfer protein, CETP

Les IDL sont des lipoprotéines de diamètre (25-50 nm) et de densité (1,006-1,019) intermédiaire. Elles sont composées de 18% de protéines, principalement l'apoB100 et de l'apoE, et de 82% de lipides avec un rapport cholestérol/TG proche de 1 [47].

Les LDL, acronyme de Low Density Lipoprotein, sont les produits finaux du catabolisme des VLDL. Ils sont issus de l'action de la lipase hépatique, localisée à la membrane des hépatocytes, sur les IDL. L'implication des LDL dans la formation de la plaque d'athérome leur vaut le terme de « mauvais cholestérol ». Ainsi, les LDL pénètrent dans la paroi du vaisseau et se fixent, via l'apoB100 aux protéoglycanes constituant la matrice

extra-cellulaire. L'oxydation des LDL modifie la charge de l'apoB100 et favorise son internalisation par les macrophages via le récepteur Scavenger. L'accumulation des lipides dans ces cellules altère leur comportement et conduit à la formation de cellules spumeuses. Ces dernières vont sécréter des facteurs de croissances, attirant les cellules musculaires lisses dans la zone sous endothéliale [48]. Les cellules spumeuses et musculaires lisses vont participer à la formation d'une cape fibreuse entourant un noyau lipidique [49]. La taille des LDL est variable et peut constituer un risque supplémentaire. En effet, des particules de petite taille présentent une affinité diminuée pour le récepteur aux LDL conduisant à leur accumulation dans le plasma. De plus, leur taille réduite favorise également leur oxydation et leur incorporation dans la paroi des vaisseaux participant ainsi au développement de la plaque d'athérome.

Les particules de haute densité HDL, pour High Density Lipoprotein, sont composées à 50% de protéines, majoritairement l'ApoA1 et A2 ainsi que de lipides telles que le cholestérol et les phospholipides. Elles sont responsables du transport de cholestérol des tissus périphériques au foie et participent ainsi à l'élimination du cholestérol de l'organisme. Cette voie, appelée transport inverse du cholestérol (RCT), confère aux HDL des propriétés anti-athérogéniques qui lui valent le surnom de « bon cholestérol ».

Une dernière classe de lipoprotéines, les lipoprotéines à apo(a) (Lp(a)) a été identifiée par Kare Berg en 1963 [50]. Bien que son association avec les maladies cardiovasculaires soit connue, la grande variabilité inter-individuelle due à des difficultés de standardisation la rend peu utilisée comme marqueur prédictif de risques cardio-vasculaires [51]. Cette particule est similaire au LDL auquel s'est ajoutée une glycoprotéine apo(a) à l'apoB100 via un pont dissulfure. Près d'un demi siècle après sa découverte, son rôle reste mal caractérisé.

Rôle majeur du foie dans le métabolisme lipidique

Le foie joue un rôle majeur dans le métabolisme du cholestérol. Cet organe est le lieu central du métabolisme des lipoprotéines, évoqué dans le chapitre précédent. Le foie capte les lipides exogènes alimentaires et endogènes via les chylomicrons résiduels, les LDL et les HDL. Il possède également une activité sécrétrice de lipoprotéines à ApoB et apoA telles que les VLDL et les HDL. En plus de son rôle dans l'internalisation et la sécrétion de lipoprotéines, le foie est l'organe central de la synthèse de cholestérol et des acides biliaires.

4.1 Synthèse de cholestérol

La synthèse du cholestérol est principalement réalisée par le foie et l'intestin. Elle peut être scindée en cinq grandes étapes. La première consiste à produire du mévalonate à partir d'acétyl-CoA. L'acétyl-CoA C acétyltransférase, ou thiolase, associe deux acétyl-CoA ensemble. Ensuite, l'Hydroxyméthylglutaryl-CoA synthase (HMG-CoA synthase) permet l'ajout d'un troisième acétyl-CoA afin de former l'hydroxyméthylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA). Enfin, l'HMG-CoA subit une réaction d'oxydoréduction par l'hydroxyméthylglutaryl-CoA réductase (HMG-CoA R) pour former le mévalonate. Les effets hypocholestérolémiantes des statines reposent sur leur capacité à inhiber l'HMG-CoA R [52]. La seconde étape conduit à la synthèse d'isoprénoïde. Le mévalonate va subir trois phosphorylations successives afin de former le mevalonate-3-phospho-5-diphosphate. Deux réactions de décarboxylation vont ensuite conduire à la synthèse d'isoprénoïde. L'étape suivante repose sur la condensation de six isoprénoïdes afin de former le squalène. La 4ème étape permet la cyclisation du squalène afin de former les quatre cycles composant

le noyau stérane du lanostérol. Enfin la dernière étape permet la conversion du lanostérol en cholestérol. Cette étape comporte 19 réactions successives.

4.2 Rôle hépatique dans le métabolisme des acides biliaires

4.2.1 Biosynthèse des acides biliaires

La synthèse des acides biliaires a lieu dans le foie au sein des hépatocytes à partir de cholestérol (figure 4.1) [53] [54]. Elle se scinde en deux voies distinctes. La voie classique ou neutre, aboutissant à la production d'acide cholique (CA), implique l'action de l'enzyme cholestérol-7 α -hydroxylase (CYP7A1) responsable de l'ajout d'un groupement hydroxyle sur le 7 $^{\text{ème}}$ carbone en position α . Cette voie constitue la voie majoritaire de synthèse des acides biliaires [55] [56]. La voie alternative, responsable de la synthèse de l'acide chénodéoxycholique (CDCA) débute avec l'enzyme stérol-27 α -hydroxylase (CYP27A1) ajoutant un groupement hydroxyle sur le 27 $^{\text{ème}}$ carbone en position α . A l'issue de leur synthèse, le CA et le CDCA sont conjugués à la taurine ou à la glycine [57]. Ainsi, une grande majorité des acides biliaires nouvellement produits chez l'Homme, et stockés dans la vésicule biliaire, sont sous forme conjuguée. La conjugaison des acides biliaires réduit l'internalisation passive de ces derniers par l'intestin, limitant ainsi les conséquences délétères dues à leurs effets cytotoxiques. Chez la souris, les acides biliaires sont principalement conjugués à la taurine alors que chez l'Homme les deux formes coexistent. La prise alimentaire déclenche la sécrétion des acides biliaires dans la lumière intestinale. La vidange du contenu de la vésicule biliaire dans la lumière est dépendante de l'action de la cholécystokinine (CCK) sur celle-ci. En effet, la simulation d'une prise alimentaire par l'injection de CCK provoque la sécrétion de la bile dans la lumière [58]. Ainsi, en réponse à l'arrivée du bol alimentaire, les cellules entéro-endocrines sécrètent la CCK, augmentant les niveaux circulants d'un facteur 5 et provoquant la contraction de la vésicule biliaire [59]. Une fois libérés dans l'intestin, les acides biliaires primaires sont convertis en acides biliaires secondaires et déconjugués par les bactéries qui composent le microbiote intestinal.

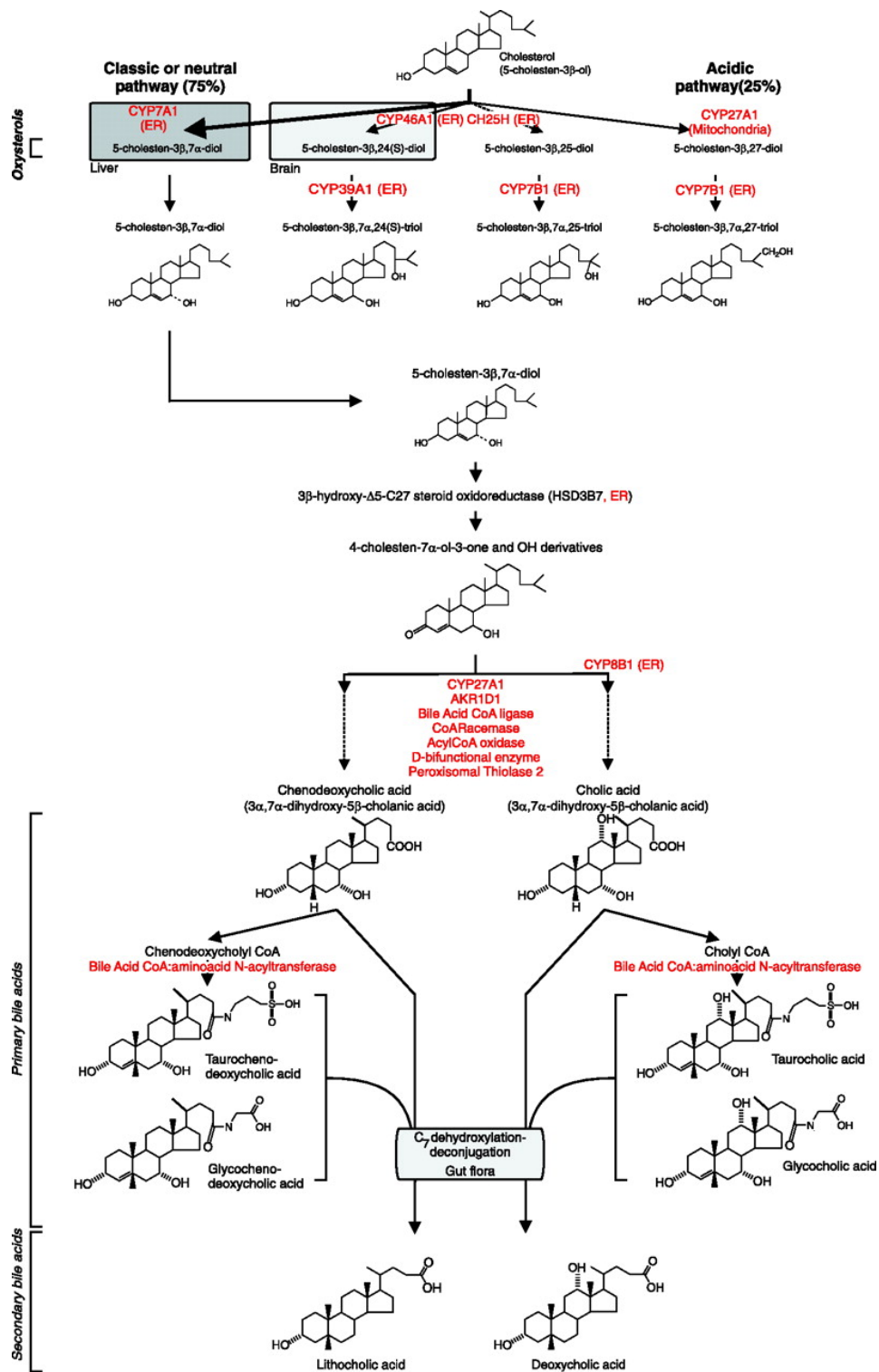


FIGURE 4.1 – Représentation des différentes voies de biosynthèse des acides biliaires. Aldo-Keto Reductase Family 1 Member D1, AKR1D1; Cytochrome P450 Family 27 Subfamily A Member 1, Cyp27A1; cytochrome P450 family 7 subfamily A member 1, CYP7A1; cytochrome P450 family 46 subfamily A member 1, CYP46A1; cytochrome P450 family 36 subfamily A member 1, CYP36A1; Cytochrome P450 Family 7 Subfamily B Member 1, CYP7B1; Cytochrome P450 Family 8 Subfamily B Member 1, CYP8B1; cholesterol-25-hydrolase, CH25H, ER, Réticulum endoplasmique (d’après Lefebvre P et al 2007)

4.2.2 Rôle des acides biliaires dans le métabolisme lipidique

FXR

Les acides biliaires, de par leur organisation stérique variant d'une forme à l'autre, présentent une affinité différente pour le farnésoid X receptor (FXR). En effet, la présence d'un groupement hydroxyle en position alpha C7 favorise cette interaction. Ainsi, le CDCA présente une affinité optimale pour FXR à la différence du DCA et de l'acide lithocholique (LCA). La génération de souris déficientes en FXR suggère que les acides biliaires, par leur action activatrice sur FXR, modulent le métabolisme lipidique. En effet, la délétion totale de FXR augmente les niveaux circulants et hépatiques de cholestérol et de triglycérides. FXR est exprimé à la fois par les hépatocytes et les entérocytes. Au niveau intestinal, une fois internalisés dans les entérocytes, les acides biliaires activent FXR, provoquant une augmentation de l'expression des gènes favorisant leur absorption intestinale. Ainsi, l'expression de ASBT (internalisation apicale), IBABP (transport intracellulaire) et OST α (efflux basolatéral) est augmentée suite à l'activation de FXR [60] [61] [62] [63]. L'activation de FXR induit également l'expression du facteur de croissance 15 (FGF15) chez la souris ou 19 (FGF19) chez l'homme. La sécrétion plasmatique de FGF par l'intestin conduit à une réduction de la synthèse hépatique des acides biliaires via une réduction de l'expression de CYP7A1 [64]. L'activation spécifiquement intestinale de FXR entraîne une amélioration globale du profil métabolique. Les travaux de Sungsoon F et al. montrent une réduction de la prise de poids et de l'inflammation ainsi qu'une augmentation de la sensibilité à l'insuline et une beigeisation du tissu adipeux blanc à la suite de l'activation de la forme intestinale de FXR [65]. Il a également été montré que l'activation ciblée de la forme intestinale de FXR s'associe à une baisse des niveaux circulants de cholestérol et à une réduction de la synthèse hépatique des acides biliaires [64]. Ces observations sont cependant nuancées par d'autres études reliant l'inhibition de la forme intestinale de FXR à une amélioration du profil métabolique chez la souris [66][67]. L'inhibition génétique [66] ou induite par l'administration des formes conjuguées de l'acide β -muricholique [66][67] réduit l'insulinorésistance, la prise de poids provoquée par un régime gras ainsi que le développement de la stéatose hépatique.

Au niveau hépatique, suite à l'absorption intestinale, les acides biliaires plasmatiques vont venir se fixer à FXR. L'activation de FXR dans le foie renforce, dans un premier temps, l'inhibition de la synthèse hépatique d'acides biliaires via l'inhibition de CYP7A1.

De plus, la sécrétion dans la bile et la conjugaison des acides biliaires vont également être stimulées par l'activation de FXR. Ce dernier est également impliqué dans le métabolisme lipidique. Suite à l'activation de FXR, la production de VLDL est réduite via une baisse de la synthèse de TG et de l'expression de la MTP [68] [69]. En plus d'une baisse de la production de VLDL, leur catabolisme est augmenté par l'accroissement des récepteurs aux VLDL et par une facilitation de leur hydrolyse par la LPL via une augmentation de l'apoCII et une réduction de l'apoCIII et d'ANGPTL3 [70] [71] [72] [73]. L'activation de FXR va également s'accompagner d'une augmentation des niveaux intracellulaires de cholestérol. En effet, l'inhibition de CYP7A1, responsable de la synthèse des acides biliaires, conduit à l'augmentation du cholestérol qui n'est plus utilisé comme substrat dans la biosynthèse des acides biliaires. De plus, l'activation de FXR accroît l'expression du LDLr et donc l'internalisation du LDL cholestérol par le foie [74]. En outre, l'augmentation de l'expression du LDLr est renforcée par la réduction des niveaux circulants de PCSK9, l'inhibiteur naturel du LDLr [75].

TGR5

Le récepteur TGR5, découvert en 2002, est préférentiellement activé par le LCA [76] [77]. Dans l'intestin, l'expression du TGR5 est principalement localisée dans l'iléon et dans le colon [76] [78]. Le récepteur TGR5 est exprimé par les cellules entéro-endocrines (Cellules L) et par les cellules neuronales intestinales. L'expression de TGR5 au sein du système nerveux entérique est particulièrement restreinte aux moto-neurones inhibiteurs du plexus myentérique [79]. Ainsi, l'activation de TGR5 limite la vidange gastrique [80]. L'activation du TGR5 présent au niveau des cellules L déclenche la sécrétion du glucagon-like peptide-1 (GLP1) et du neuropeptide Y (PYY) [81]. Le GLP1, connu pour stimuler la sécrétion d'insuline, réduire la vidange gastrique et déclencher le phénomène de satiété, a été particulièrement étudié dans le contexte du diabète de type 2 (DT2) [82]. Cependant, ses effets ne sont pas réduits au métabolisme glucidique puisque sa sécrétion s'accompagne également d'une réduction des niveaux circulants et hépatiques de TG [83]. De façon similaire au GLP 1, PYY est sécrété par les cellules L, mais son expression moins abondante dans le duodenum, augmente tout au long du tractus intestinal [84]. Le rôle de PYY sur le transit intestinal et la satiété est similaire à celui du GLP 1 [85]. Son rôle dans le métabolisme lipidique, et particulièrement celui du cholestérol, a été suggéré par

des études montrant une relation inverse des niveaux circulants de PYY et du cholestérol [86] [87]. En effet, la supplémentation de PYY au milieu de culture de cellules entérocytaires humaines (CACO 2) module le transport et la synthèse *de novo* de cholestérol [88]. L'ajout de PYY réduit l'internalisation du cholestérol par les Caco-2 via une baisse de l'expression du transporteur Niemann Pick C1-Like 1 (NPC1L1). L'activité de l'enzyme HMGCOAR est augmentée suite à l'administration de PYY. Enfin, la sécrétion de CM est réduite du fait d'une baisse de production de l'apoB 48.

4.3 PCSK9, un régulateur clef du métabolisme du cholestérol

4.3.1 Découverte de PCSK9

PCSK9 est le parfait exemple du passage réussi de la recherche fondamentale à la recherche clinique puisqu'il s'est écoulé moins d'une quinzaine d'années entre sa découverte et l'autorisation de mise sur le marché d'inhibiteurs. PCSK9, co-découverte franco-canadienne en 2003 [89] [90], est le 9ème membre de la famille des protéines convertases. Les protéines convertases sont sous divisées en trois groupes : les « kexines like », les « pyrolyses like » et les « protéines K like ». Le groupe des 7 premières protéines convertases, appartenant au groupe des kexines like, est constitué des membres suivants : les protéines convertases 1, 2, 4, 5 et 7 (respectivement, PC1, PC2, PC4, PC5 et PC7), la furine (PC3) et PACE4. Leur rôle consiste à cliver, sur un site consensus, les précurseurs de protéines sécrétées. Cette réaction peut avoir lieu dans les granules de sécrétion, l'appareil de Golgi, la surface cellulaire, les endosomes ou dans la matrice extra cellulaire. Le 8ème membre, connu sous le nom de SKI 1 pour subtilysine kexine iszyme 1, est impliqué dans le métabolisme lipidique, le stress cellulaire, la minéralisation des os, le développement neuronal et dans l'infection virale. Il est retrouvé dans l'appareil de Golgi, les endosomes et les lysosomes. Enfin, PCSK9 est le dernier membre identifié de cette famille et appartient au sous-groupe des « proteinases K like ». Connue, à l'origine, sous le nom de NARC1 pour neural apoptosis-regulated convertase 1, elle a été identifiée en 2003 par l'équipe de Nabil Seidah à Montréal [89]. Dans cette même étude ils localisent l'expression de PCSK9 dans le cerveau, le foie et l'intestin, en particulier les segments jéjunaux et iléaux. Les

niveaux d'expression de PCSK9 sont particulièrement élevés durant l'embryogenèse suggérant un rôle de PCSK9 dans le développement. De plus, ils notent une augmentation de l'expression de PCSK9 après hépatectomie renforçant l'hypothèse d'un rôle de PCSK9 dans le processus de prolifération cellulaire. La même année, le groupe Parisien de Catherine Boileau, en collaboration avec le groupe de Montréal, identifie deux mutations sur PCSK9 associées à un phénotype d'hypercholestérolémie familiale [90]. À l'issue du séquençage de 12 exons de PCSK9 dans 3 familles hypercholestérolémiques, ils identifient une substitution d'une sérine par une arginine (S127R) et d'une phénylalanine par une leucine (F216L) respectivement en position 127 et 216. Ces deux mutations, qualifiées de gain de fonction (GOF), sont responsables d'une augmentation de la cholestérolémie. Depuis sa découverte, plus d'une cinquantaine de mutations ont été identifiées [91]. En 2004, le groupe de Jan L Breslow à New York caractérise le mode d'action de PCSK9. Ainsi, ils démontrent que PCSK9 régule négativement le niveau d'expression du LDLr [92].

Bien que la forme hépatique de PCSK9 soit la plus étudiée, le foie n'est pas l'unique organe à exprimer PCSK9. Ainsi, l'intestin, le pancréas endocrine, les reins ainsi que le cerveau expriment également PCSK9 [93].

Le rôle de la forme intestinale de PCSK9 sera développé dans la partie 5.13.

À l'origine PCSK9 a été identifiée dans les neurones [89] ce qui lui vaut sa première appellation NARC1. Son expression augmentée durant l'embryogenèse suggère un rôle dans le développement cérébral [89]. En effet, l'inhibition de PCSK9, dans un modèle de poisson zèbre, altère le développement cérébral et conduit à la mort de l'embryon. Cependant les modèles murins délétés de la protéine PCSK9 (modèle knock out ou KO) ne semblent présenter aucune altération du développement cérébral [94]. Actuellement, aucune preuve de lien n'a été faite entre l'absence de PCSK9 et le développement d'anomalies neuro-cognitives [95].

Plusieurs études suggèrent que PCSK9 pourrait être impliquée dans le métabolisme glucidique. En effet, les niveaux plasmatiques de PCSK9 sont augmentés chez les patients diabétiques ou après un régime riche en fructose chez des patients sains [96] [97]. Ces résultats sont cependant nuancés par l'absence de modification des concentrations de PCSK9 après un régime d'un an et malgré une perte de poids significative [98]. La présence du LDLr, cible de PCSK9, à la membrane des cellules beta des îlots de Langerhans renforce l'hypothèse d'un rôle de cette dernière dans le métabolisme glucidique [99]. L'appauvris-

sement intracellulaire en cholestérol, dans des ilots humains isolés, augmente la sécrétion d'insuline induite par le glucose [100]. A l'inverse, l'ajout de LDL dans le milieu de culture de ces mêmes ilots réduit la sécrétion d'insuline provoquée par le glucose [19]. Les données contradictoires obtenues chez les animaux PCSK9 KO ne permettent pas de conclure sur le rôle potentiel de la forme de PCSK9 exprimée par le pancréas endocrine [101]. De plus, chez l'homme, de nombreux essais cliniques n'ont révélé aucun lien entre l'inhibition de PCSK9, *via* l'injection d'anticorps anti-PCSK9, et l'altération du métabolisme glucidique.

L'expression de PCSK9 dans le rein, en particulier, durant des étapes clefs de l'embryogénèse, suggère un rôle dans la néphrogénèse [89]. Dans le rein, PCSK9 est responsable de la dégradation de ENac, protéine impliquée dans la réabsorption du sodium [102] [103]. Cependant, La génération de souris PCSK9 KO ne montre aucun impact de l'absence de PCSK9 sur la tension artérielle [104].

Enfin, PCSK9 est également exprimée et localement sécrétée par les cellules musculaires lisses [105][106]. Son expression est augmentée dans les zones à faible force de cisaillement, zones coïncidant avec celles à forte susceptibilité de développer l'athérosclérose [106]. De plus, une étude clinique a démontré que l'inhibition de PCSK9 par des anticorps stabilisait les plaques d'athérome [106].

4.3.2 Structure et rôle de PCSK9

PCSK9 est synthétisée dans le réticulum sous la forme d'une pro-enzyme, ou zymogène, de 692 acides aminés. La forme initiale de PCSK9, dont la taille est de 73 kilo dalton (kDa), est composée d'une première séquence correspondant au peptide signal. Le pro-domaine s'étend de l'acide aminé 31 à 152. Le domaine catalytique est localisé à la suite du pro-domaine de la position 153 à 451. Ce domaine comprend la séquence capable de fixer le domaine EGFa du LDLR [107] [108]. Enfin, le domaine C-terminal constitue la dernière séquence de PCSK9 de l'acide aminé 452 à 692 (figure 4.2).

PCSK9 subit une série de modifications post-traductionnelles au cours de sa maturation (figure 4.3). Au sein du RE, PCSK9 est autoclivée entre le pro-domaine et le domaine catalytique en position 152. Bien qu'il ait été clivé, le pro-domaine reste lié à PCSK9 par des liaisons non covalentes [89] [109] [110]. L'étude de la structure en 3 dimensions par cristallographie révèle que PCSK9, à l'issue du clivage autocatalytique, adopte une conformation en pyramide composée du pro-domaine lié aux domaine catalytique et à la partie

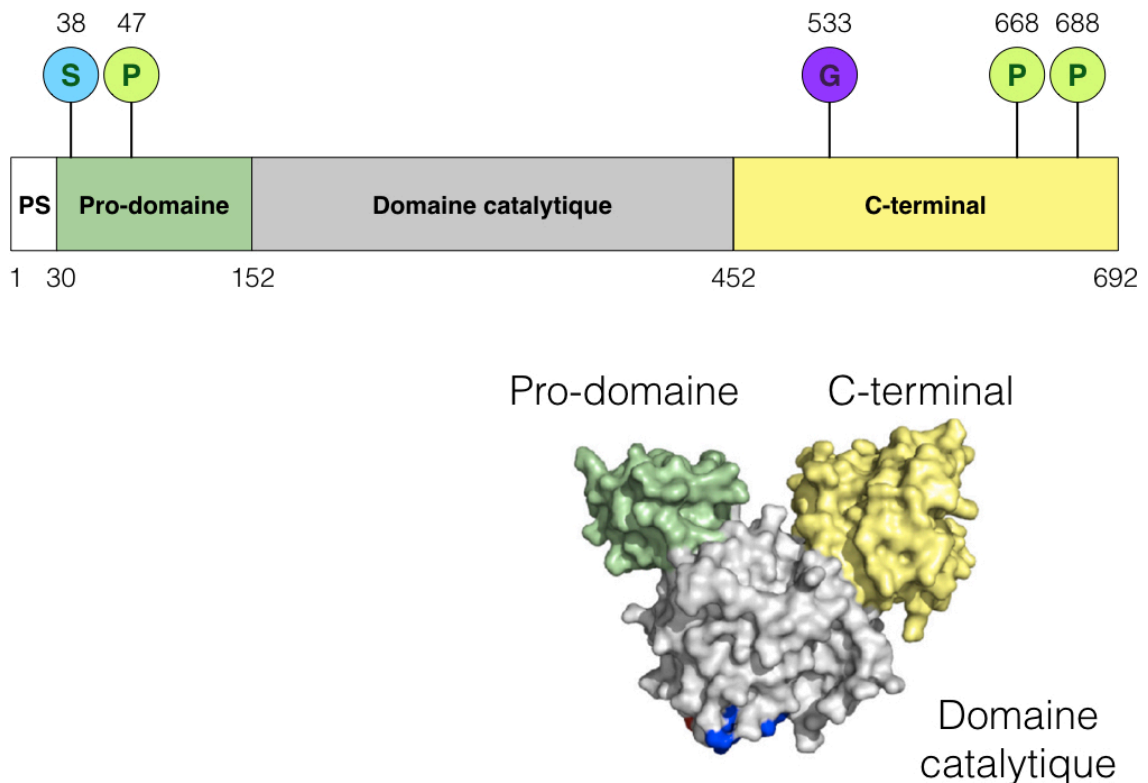


FIGURE 4.2 – Structure de PCSK9 (d’après Cunningham D et al 2007)

C-terminale et confirme, ainsi, que le pro-domaine reste fixé à PCSK9 (figure 4.2) [109]. Le clivage du pro-domaine est nécessaire à l’exportation de la protéine vers le Golgi et permet sa sécrétion par la cellule [89]. Une délétion partielle du pro-domaine réduit la capacité de PCSK9 à être autoclivée et sécrétée, suggérant un rôle de protéine chaperone [111]. De plus, le changement conformationnel résultant du clivage du pro-domaine favorise l’interaction avec le domaine EGFA du LDLR [108]. Au sein du RE, l’asparagine en position 533 est N-glycosylée [89]. A l’heure actuelle, il s’agit du seul site de glycosylation décrit dans la littérature. L’absence de glycosylation induite par un traitement à la tunicamycine ou par mutagenèse dirigée ne semble impacter ni la maturation ni la sécrétion de PCSK9 [89]. La N-glycosylation est constituée d’une base commune à toutes les protéines N-glycosylées, constituées de deux N-acétylglucoamines et de trois mannoses, et d’une antenne comptant au départ six mannoses et trois glucoses (Figure 4.4 (1)). La N-glycosylation des protéines débute dans le reticulum endoplasmique par l’ajout du complexe glycosylé sur une asparagine. Chaque sucre est relié au suivant par des liaisons alpha ou beta. Dans le réticulum, les 3 glucoses sont digérés par les alpha glucosidases 1

et 2 et un mannose de l'antenne est digéré par une alpha mannosidase (figure 4.4 (2)). La protéine est ensuite exportée vers le Golgi par la protéine cargo COPII [112]. Chen et al ont ainsi montré que le transport intracellulaire de PCSK9 est dépendant de la protéine SEC24A, protéine du complexe COPII. Ainsi, la délétion de *sec24a* réduit la sécrétion de PCSK9. Au sein du Golgi, PCSK9 subit une modification de son groupement N-glycosylé, une série de phosphorylations, une sulfatation ainsi qu'un second clivage. Dans le Golgi, Une alpha mannosidase associée au Golgi retire 3 mannoses supplémentaires (figure 4.4 (4)). À ce stade, le groupement N-glycosylé peut ne plus subir d'autres modifications et être considéré comme mature. Cependant, ce groupement peut également subir l'ajout de sucres tels que le galactose, la N-acétylglucoamine ou l'ajout d'acide sialique (figure 4.4 (5)) [113].

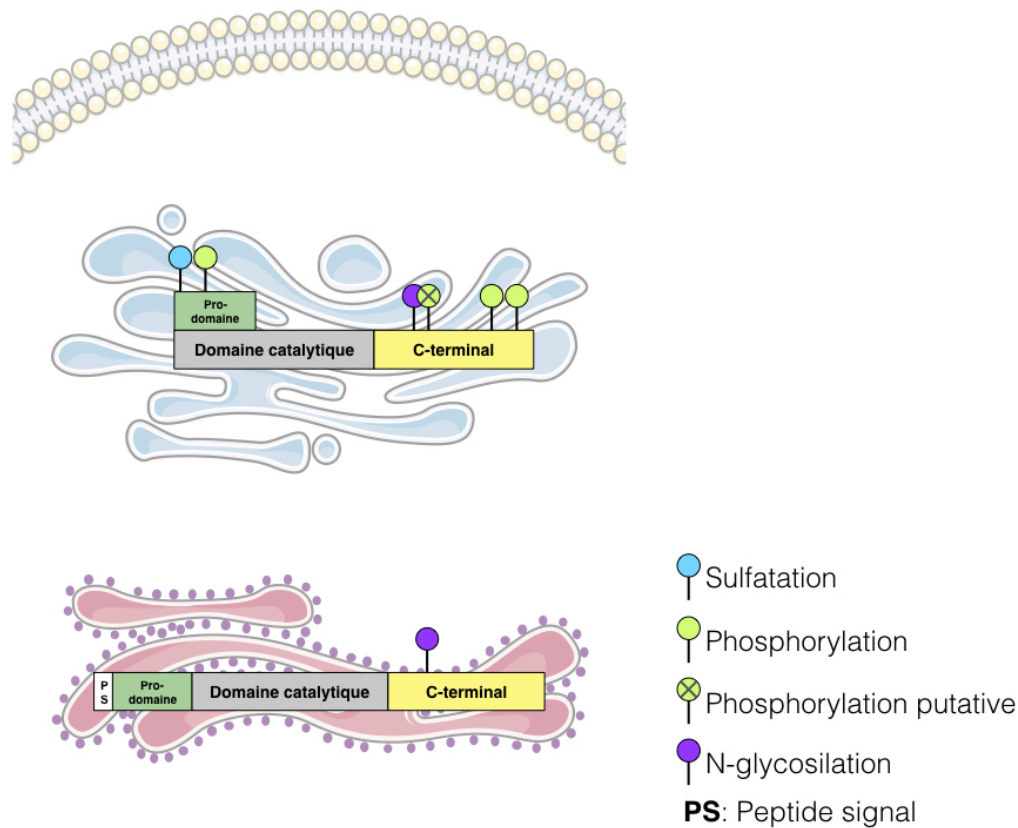


FIGURE 4.3 – Maturation et modifications post-traductionnelles de PCSK9

PCSK9 comprend trois sites de phosphorylation, un dans le pro-domaine en position 47 et deux dans la partie C-terminale en position 668 et 688. Les travaux de Dewpura T et al suggèrent que la phosphorylation de PCSK9 impacte sur sa stabilité sans altérer sa sécrétion [114]. Leurs travaux n'ont cependant pas permis d'identifier la protéine kinase

responsable de la phosphorylation de PCSK9. En 2015, Vincent S. Tagliabracci et al, caractérisent le rôle de la protéine kinase Fam20c dans la phosphorylation des protéines du sécrétome [115]. L'inhibition de Fam20C par la génération d'un crispr-cas9, montre une baisse de la sécrétion de PCSK9, suggérant que l'état de phosphorylation de PCSK9 ou de l'un de ses partenaires pourrait altérer sa sécrétion.

Les travaux du groupe de Nabil Seidah ont permis d'identifier deux sites de sulfation sur des tyrosines, un majeur dans le pro-domaine en position 38 et un mineur dans le domaine catalytique. Une délétion de la sulfatation dans le pro-domaine, par mutagenèse dirigée n'altère ni la sécrétion ni la fixation de PCSK9 au LDLR [116]. De plus une inhibition, à l'aide d'un ionophore calcique, de la sulfotransférase responsable de la sulfatation des tyrosines confirme que la sulfatation de PCSK9 ne modifie pas sa sécrétion et sa fixation aux LDLR.

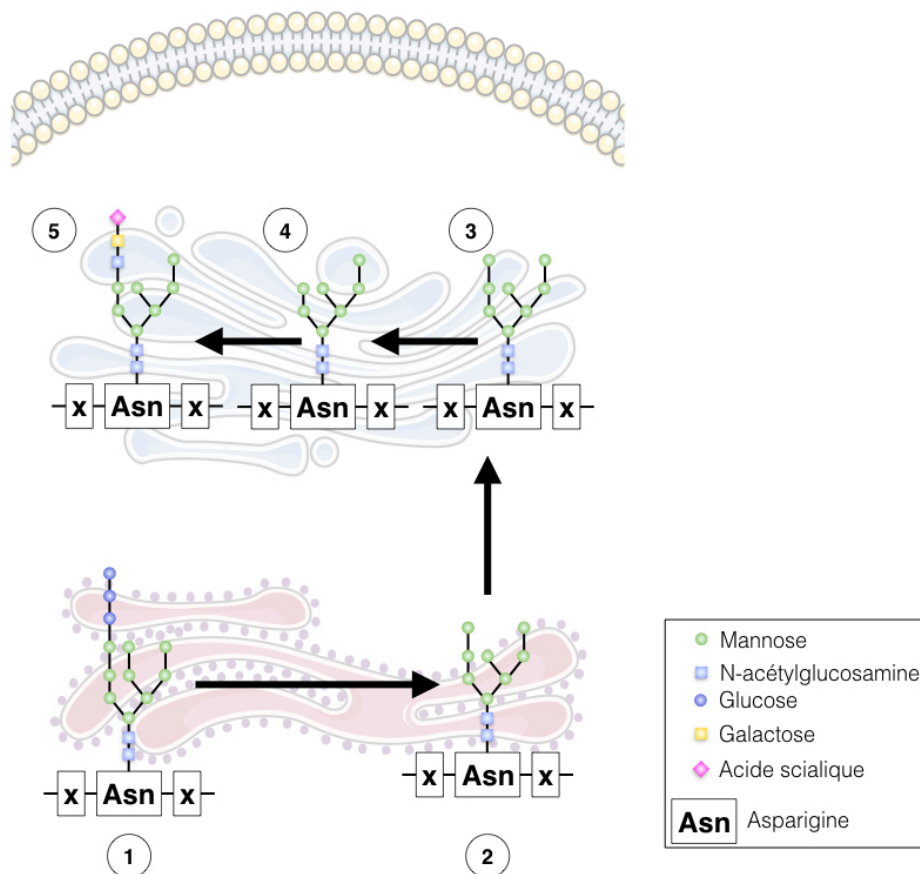


FIGURE 4.4 – Modification de la N-glycosylation au cours de la maturation de PCSK9

Dans le Golgi, PCSK9 peut subir un second clivage réalisé par deux protéines convertases, la furine (PACE3, PCSK3) et PC5/6A (PCSK5) [116]. Ce clivage, en position 218, n'altère pas sa capacité de sécrétion mais réduit son affinité pour le LDLr d'un facteur

10 [117]. Ainsi, une inhibition de la plupart des protéines convertases, à l'exception de PCSK9, réduit d'environ 90% les niveaux de LDLr. L'utilisation d'endoglycosidase H (endoH) a permis d'identifier le compartiment cellulaire où a lieu ce clivage. Le mode d'action de l'endoH repose sur la modification des groupements sucrés au cours de la maturation des protéines et permet ainsi de différencier les protéines présentes dans le réticulum de celles localisées dans le Golgi. En effet, les groupements sucrés riches en mannose dans le réticulum se complexifient par la substitution des mannoses par des fucoses, des galactoses et des acides sialiques, les rendant ainsi résistants à l'endoH. S Benjannet et al. montrent que ce clivage a lieu à partir du Golgi car présent uniquement sur les forme de PCSK9 résistantes à l'endoH. En tenant compte de l'expression de la furine et de PCSK5, ils ont déduit que ce clivage pourrait avoir lieu dans le Golgi, les endosomes et au niveau de la membrane plasmique [118] [116].

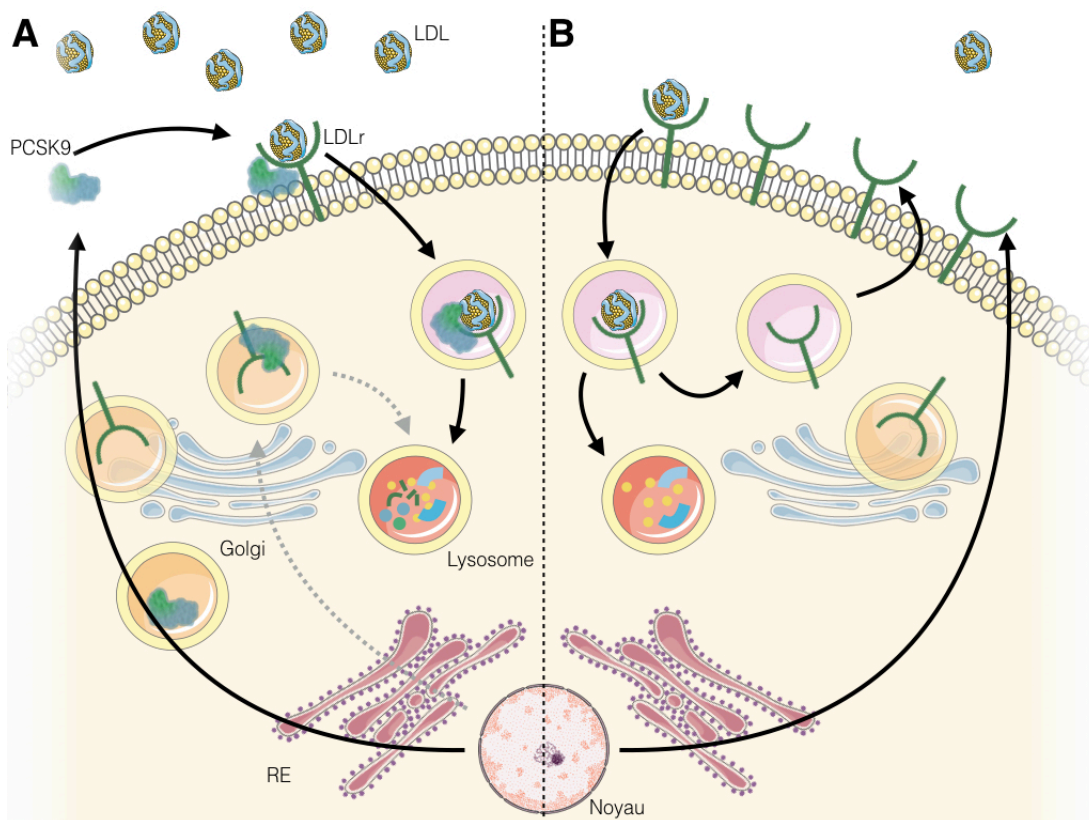


FIGURE 4.5 – Représentation du mécanisme d'action de PCSK9

Une fois sécrétée, PCSK9 se fixe au LDLr entraînant son internalisation puis sa dégradation au lieu de son recyclage à la membrane. L'interaction entre PCSK9 et le LDLr met en jeu le domaine catalytique de PCSK9 et celui de l'EGFa du LDLr [119] [108]. Plusieurs études montrent que cette interaction est favorisée par un pH acide [109] [120].

Bien que l'interaction entre PCSK9 et le LDLR fasse intervenir principalement le domaine catalytique, le pro-domaine est également sollicité. Ainsi, la leucine en position 108 de PCSK9 et celle en position 626 du LDLR créent une liaison de Van der Waals [121]. De plus, des mutations localisées dans le pro-domaine (R46L, S127R et D129G) et dans la partie C-terminale (R496W et H553R) modulent l'affinité de PCSK9 pour le LDLR. En l'absence de PCSK9, la fixation du LDL à son récepteur entraîne l'invagination du complexe LDL-LDLR au sein d'une vésicule de clathrine. L'acidification du pH favorise la séparation du LDL de son récepteur permettant le recyclage de ce dernier à la membrane, tandis que la particule de LDL est dirigée vers le lysosome pour ensuite être dégradée [122]. La fixation de PCSK9 au LDLR entraîne ce complexe vers le lysosome, empêchant ainsi le retour du récepteur aux LDL à la membrane. Une fois internalisé, le complexe PCSK9-LDLR ne se dissocie pas puisque l'acidification du pH renforce l'interaction entre ces deux protéines [123]. La sécrétion de PCSK9 n'est cependant pas essentielle pour dégrader le LDLR [124] [125]. Saavedra et al montrent ainsi qu'une forme recombinante de PCSK9, dont on a retiré une partie du domaine C-terminal, n'est pas capable de dégrader le LDLR si elle est ajoutée en extracellulaire [126]. De plus, l'étude de la mutation S127R révèle que cette forme de PCSK9 n'est pas sécrétée mais capable de dégrader le LDLR, renforçant ainsi l'hypothèse qu'il existe une voie intracellulaire de dégradation du LDLR par PCSK9 [127].

Les niveaux de LDLR à la membrane des hépatocytes conditionnent l'efficacité de l'internalisation du LDL-c circulant. Ainsi, une quantité réduite de LDLR provoque l'accumulation de LDL cholestérol dans le plasma et s'accompagne d'une augmentation des risques cardiovasculaires. À l'inverse, une quantité importante de LDLR permet de capter une quantité plus importante de LDL-c et de réduire ainsi les risques de développer une pathologie cardiovasculaire. De nombreuses mutations sur PCSK9 ont été identifiées et associées à un profil plus ou moins bénéfique sur le plan cardiovasculaire [128]. En effet, les mutations "perte de fonction", caractérisées par la production d'une protéine moins voire non fonctionnelle, sont associées à une baisse importante de la cholestérolémie et des co-morbidités cardiovasculaires [128]. Deux mutations "perte de fonction" (Y142X et C679X), dont la prévalence est élevée dans la population afro-américaine (2%), sont responsables d'une réduction de 28% des niveaux de LDL-c et d'une baisse de 88% de développer des maladies cardiovasculaires [129] [130]. Une grande majorité des mutations

“perte de fonction”, dont les deux évoquées précédemment, se caractérise par l’incapacité de PCSK9 à être sécrétée. En effet, ces mutations vont engendrer un défaut de conformation entraînant la rétention de PCSK9 dans le réticulum et sa dégradation, l’empêchant ainsi d’être sécrétée [128]. La mutation R46L, la plus répandue, se caractérise par une réduction de la phosphorylation de la sérine en position 47, dont les conséquences ne sont pas encore connues mais qui pourraient affectées sa stabilité ou son affinité pour le LDLr [114] [120]. Le clivage de PCSK9 par la furine a pour conséquence de réduire sa dim-vie [116]. Ainsi, la mutation A443T, favorisant le clivage de PCSK9 par la furine, réduit sa durée de vie et par conséquence, augmente le nombre de LDLr à la membrane [131]. Enfin, ces mutations peuvent également altérer l’affinité de PCSK9 pour le LDLR. La mutation N157K, altérant la conformation de PCSK9, réduit son affinité pour le LDLr [107].

À l’inverse, les mutations “gain de fonction” conduisent à l’élévation de la cholestérolémie et par voie de conséquence à l’augmentation des risques cardiovasculaires [132]. À l’exception de la mutation C332A, augmentant la transcription de PCSK9, la totalité des autres mutations identifiées ont un impact post-traductionnel sur PCSK9 [128]. Certaines mutations vont augmenter l’affinité de PCSK9 pour le LDLr. Le clivage autocatalytique de PCSK9 dans le réticulum a pour conséquence de réduire l’affinité de PCSK9 pour le LDLR. En effet, le prodomaine, lorsqu’il n’est pas clivé, augmente l’affinité de PCSK9 pour le LDLR [133]. Ainsi, les mutations S127R et D129G, altérant le clivage du prodomaine, augmentent jusqu’à 5 fois l’affinité de PCSK9 pour le LDLR [134]. Les mutations “gain de fonction” peuvent être responsables d’une augmentation de la stabilité du complexe formé par PCSK9 et le LDLr. Les mutations L108R et D129N, par leur action sur la stabilité du complexe PCSK9-LDLr, provoquent un accroissement de la dégradation du LDLr [135]. Ces mutations peuvent également modifier la stabilité de PCSK9. Ainsi, l’inhibition de la digestion de PCSK9 par la furine induite par les mutations R215H, R218S, F216L et D374Y augmente sa stabilité et par conséquence réduit les niveaux de LDLr à la membrane [116] [136] [125].

L’identification des mutations "perte de fonction" a suscité un vif intérêt dans le développement de thérapies visant à lutter contre l’hypercholestérolémie en ciblant PCSK9. Ainsi, différentes stratégies ont été développées, s’inspirant des mutations "perte de fonction", afin d’inhiber PCSK9. Ces stratégies consistent, entre autre, à prévenir l’interaction de PCSK9 avec le LDLr ou à réduire son expression. L’inhibition de l’interaction entre

PCSK9 et le LDLr par l'intermédiaire d'anticorps constitue à ce jour la stratégie la plus aboutie. De nombreux essais cliniques ont démontré l'efficacité ainsi que la sécurité d'injecter des anticorps monoclonaux dirigés contre PCSK9 [137] [138] [139]. Ils notent ainsi une diminution de 50% à 60% des niveaux de LDLc avec les doses maximales. Ce traitement permet également de réduire significativement la concentration de Lp(a) ainsi que d'induire une tendance à la baisse d'ApoB plasmatique et qu'une tendance à la hausse des niveaux de HDLc. Ces études ont rendu possible l'autorisation de mise sur le marché de deux anticorps (Praluent et Repatha) durant l'été 2015^{1 2}. Le coût de ce traitement approchant les 14 000 \$ par an et par patient, sa distribution aux États-Unis reste très limitée, retardant également son autorisation de mise sur le marché en France [137]. Malgré d'excellents résultats, en raison de la faible demi-vie des anticorps anti-PCSK9, les injections d'anticorps doivent être répétées toutes les deux semaines. Au vu de ce constat, un groupe travaille actuellement au développement d'un vaccin dirigé contre PCSK9. Des résultats préliminaires, chez la souris, montrent une réduction de 30% des niveaux de LDLc [140].

Outre l'utilisation d'anticorps dirigés contre PCSK9, d'autres moyens thérapeutiques ont été développés dans le but de bloquer l'interaction entre PCSK9 et le LDLr. Ainsi, le développement de petits peptides, dont la taille réduite confère certains avantages dont ceux de réduire les coûts de production, de pouvoir être administré par voie orale, d'être plus rapidement éliminé de l'organisme ainsi que de pouvoir franchir la membrane plasmique des cellules. Ces peptides ont été conçus afin de se fixer au niveau du site d'interaction de PCSK9 avec le LDLR. En se basant sur la capacité de PCSK9 à se fixer sur le LDLR via le site EGFa présent sur ce dernier [119], deux peptides ont été développés : l'adnectine et un EGFa mimétique. Ces deux molécules sont capables de se fixer à PCSK9 et de contrer stériquement la fixation de PCSK9 au LDLR [141] [142]. Les résultats préliminaires de phase I de l'adnectine montre une baisse du LDL-c de 47% [143].

Une seconde stratégie consiste à réduire l'expression de PCSK9. Une des approches repose sur l'injection d'oligonucléotides antisens afin de bloquer la traduction de PCSK9 [144] [145] [146]. Les résultats de phase I montrent une baisse de 70% de la concentration hépatique en PCSK9 associée à une réduction de 40% des niveaux plasmatiques de LDLc.

1. <https://www.fda.gov/newsevents/newsroom/pressannouncements/ucm455883.htm>
2. <https://www.fda.gov/newsevents/newsroom/pressannouncements/ucm460082.htm>

Le développement d'oligonucléotides antisens est actuellement en phase II. La seconde approche repose sur la technologie CRISPR-CAS9 permettant d'éditer le génome. L'injection, via un adénovirus, d'un ARN reconnaissant l'exon 1 de PCSK9 et servant de guide à l'enzyme CAS9 capable de cliver l'ADN permet, chez la souris, de réduire de 95% les niveaux circulants de PCSK9 et de 40% la concentration plasmatique de LDLc [147].

4.3.3 Régulation de l'expression de PCSK9

La région du promoteur de PCSK9 contient deux séquences régulant son niveau de transcription (Figure 4.3). La séquence SRE, pour Sterol Regulatory Element, contient un site de fixation pour le facteur de transcription SREBP2 (Sterol Regulatory Element Binding Protein 2). La baisse des niveaux intracellulaires de cholestérol génère l'activation de SREBP2 et sa fixation sur la séquence SRE, provoquant ainsi une augmentation de l'expression de PCSK9. La séquence SRE est également présente au niveau du promoteur du LDLR. Ainsi, un traitement à base de statines, réduisant la production *de novo* de cholestérol, augment simultanément l'expression du LDLR et de PCSK9. Il existe une séquence consensus, appelée Hepatocyte Nuclear Factor 1 (HNF1) reconnue par la protéine HNF1 α [148]. Des expériences de mutagenèse dirigée suggèrent que ces deux séquences fonctionnent de façon coordonnée puisque l'inactivation de la séquence HNF1 réduit l'efficacité de fixation de SREBP2 sur la séquence SRE [148]. Des études démontrent que le statut nutritionnel régule l'expression de PCSK9. En effet, un jeûne de 24h réduit massivement les niveaux d'expression génique et protéique de PCSK9 [149]. La reprise alimentaire rétablit progressivement les niveaux circulants de PCSK9, semblables à ceux observés avant le début du jeûne. De plus, la nature du régime peut également moduler l'expression de PCSK9. Ainsi, un régime enrichi en fructose élève la concentration plasmatique de PCSK9, indépendamment de SREBP2 [97]. A l'inverse, un régime riche en cholestérol augmente l'expression de PCSK9, *via* l'inhibition de SREBP2 en réponse à l'élévation des niveaux intrahépatiques de cholestérol [150] [151].

L'insuline, dont la concentration plasmatique augmente à l'état postprandial, est un régulateur de PCSK9. Des expériences de clamp hyperinsulinémique chez la souris montrent une régulation positive de PCSK9 par l'insuline [149]. L'insuline exerçant une régulation de l'expression de nombreux gènes *via* l'activation de SREBP1c suggère que son action sur PCSK9 pourrait dépendre de SREBP1c. Ainsi, la transfection d'hépatocytes de rat

avec une forme inactive de SREBP1c bloque l'effet stimulateur de l'insuline sur PCSK9 démontrant ainsi le rôle de SREBP1c dans la régulation de PCSK9 par l'insuline. Des études ont montré que l'inflammation altérait le métabolisme lipidique [152]. Les travaux de Feingold KR et al suggèrent que l'inflammation induite par le LPS augmente significativement l'expression de PCSK9, avec pour conséquence une baisse significative du LDLr [153]. Bien que le mécanisme d'action du LPS sur l'expression de PCSK9 ne soit pas connu, ils suggèrent que cette augmentation est indépendante de SREBP mais serait due à la baisse d'activité de FXR et de PPAR α .

L'hypothyroïdie a, depuis longtemps, été associée à une hypercholestérolémie due à une baisse de l'expression hépatique du LDLr [154] [155]. Les travaux de Shin et al suggèrent que la baisse de l'expression du LDLr dépend du défaut d'activation de SREBP2 [156]. PCSK9 étant également régulée par SREBP2, il a été suggéré que l'hypercholestérolémie observée dans l'hypothyroïdie pourrait également être dépendante de PCSK9. Ainsi, des patients présentant une hyperthyroïdie, et donc des concentrations d'hormones thyroïdiennes augmentées, ont des niveaux plasmatiques de PCSK9 réduits [157]. Cette étude suggère, cependant, que la diminution de PCSK9 est indépendante de SREBP2. En effet, ils constatent que les niveaux de lathostérol, marqueur de la synthèse du cholestérol et dont la production est sous le contrôle de SREBP2, ne sont pas altérés dans l'hyperthyroïdie. Des études supplémentaires seraient nécessaires afin de mieux caractériser les mécanismes moléculaires responsables de la réduction de PCSK9 par les hormones thyroïdiennes.

Les œstrogènes ont également montré leur capacité à réguler l'expression des PCSK9. Le groupe suédois, dirigé par Bo Angelin, corrèle les niveaux faibles d'œstrogènes observés chez des femmes ménopausées avec une augmentation des concentrations plasmatiques de PCSK9 [158]. Ils montrent également, dans un contexte de stimulation ovarienne, que l'augmentation par 30 des concentrations d'œstrogènes s'associe à une réduction de 14% des niveaux circulants de PCSK9 et de LDLc [159].

Le gène *E2F1*, impliqué notamment dans la régulation du cycle cellulaire [160], a été récemment identifié comme un régulateur de l'expression de PCSK9 [161]. Ainsi, la génération de souris KO pour E2F1 présente une réduction de l'expression hépatique de PCSK9 qui s'associe à une baisse de la cholestérolémie. Bien que le mécanisme d'action de E2F1 sur PCSK9 ne soit pas connu, l'interaction entre E2F1, l'insuline et SREBP1c

[162] suggère qu'il pourrait dépendre de ces derniers.

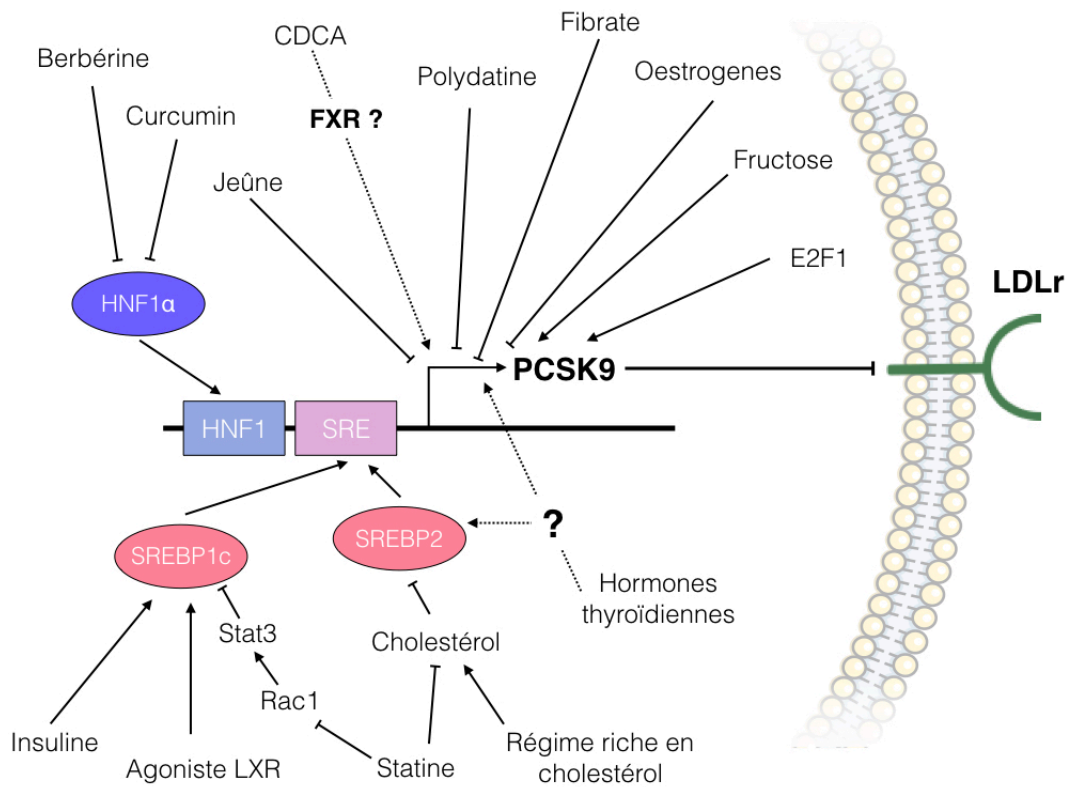


FIGURE 4.6 – Régulateurs de l'expression de PCSK9 (adapté de Costet et al 2006)

Les Statines, molécules appartenant à la classe des hypolipémiants, constituent à ce jour le traitement le plus employé pour lutter contre l'hypercholestérolémie. Compte tenu du rôle de PCSK9 dans le métabolisme du cholestérol et l'effet hypocholestérolémiant des statines, il a été rapidement suggéré que les statines pourraient agir sur PCSK9. C'est au groupe qui a découvert PCSK9 que l'on doit la première preuve de l'interaction entre les statines et PCSK9 [163]. Ils ont ainsi démontré, dans un modèle d'hépatocytes humains (HepG2) que les statines augmentent l'expression de PCSK9. Cette augmentation de l'expression de PCSK9 est due à l'appauvrissement en cholestérol du milieu intracellulaire induit par les statines. En effet, la baisse de cholestérol par les statines active le récepteur nucléaire SREBP2 stimulant, en conséquence, l'expression de PCSK9 et du LDLr [164]. De façon intéressante, Ferri et al montrent que Rac1, pour Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1, module l'expression de PCSK9. Ainsi, la fixation de Rac1 sur STAT3 provoque la translocation de ce dernier dans le noyau et inhibe SREBP1c et en conséquence réduit l'expression de PCSK9. Ils montrent également que les statines préviennent la fixation de Rac1 sur STAT, empêchant ainsi sa translocation nucléaire, ce qui participe à l'effet

stimulateur de statines sur l'expression de PCSK9 [165].

Les fibrates, agonistes du récepteur nucléaire PPAR α , sont employées dans le but d'augmenter le HDLc et de réduire la production de VLDL [166] [167]. Une étude sur des cellules hépatiques humaines immortalisées (IHH) montrent que les fibrates réduisent l'expression de PCSK9 [168]. De plus, l'inhibition de PPAR α , via l'utilisation de SiRNA, démontre que la baisse de l'expression de PCSK9 induite par les fibrates dépend de PPAR α . Ces travaux suggèrent, également, que la régulation de PCSK9 par les fibrates obéit à deux mécanismes distincts. En effet, les fibrates augmentent l'expression de PC5/6 et de la furine dont le rôle consiste à cliver PCSK9, réduisant ainsi sa demi-vie. Enfin, cette même étude démontre que l'administration de fibrates s'oppose à l'augmentation de l'expression de PCSK9 induite par les statines.

Les acides biliaires, en plus de leur rôle dans la digestion et l'absorption lipidique, sont impliqués dans le métabolisme du cholestérol [169]. Une étude sur des IHH et des HEPG2 montre que certains acides biliaires réduisent l'expression de PCSK9 [75]. En effet, l'ajout de CDCA réduit l'expression de PCSK9, avec pour conséquence une augmentation de la fixation des LDL au LDLR. De plus, une étude récente, chez l'homme, montre qu'un traitement à base de CDCA diminue les concentrations plasmatiques de PCSK9 [170]. A l'inverse, le DCA augmente l'expression de PCSK9 alors que le CA et l'acide ursodéoxicholique (UDCA) n'ont pas d'effet sur ses niveaux d'expression. L'affinité du CDCA pour FXR suggère un rôle de ce dernier dans la régulation de PCSK9 par le CDCA. Cependant, l'inhibition de FXR, via l'utilisation d'un SiRNA, ne bloque pas l'action du CDCA sur l'expression de PCSK9. Ces résultats suggèrent l'existence d'un autre médiateur impliqué dans la réduction de l'expression de PCSK9 par le CDCA. La berbérine, isolée à partir du coptide chinois, est connue dans la médecine traditionnelle pour ses vertus hypocholestérolémiantes. *In vitro*, un traitement de 15mg/ml sur un modèle de cellules hépatiques humaines immortalisées (HepG2) induit une réduction significative de l'expression ARN et protéique de PCSK9 de respectivement 77% et 87% [171]. *In vivo*, l'administration de 100 à 200 mg/kg de berbérine réduit significativement les niveaux géniques et protéiques de PCSK9 chez différentes espèces telles que la souris, le rat et le hamster [172] [173]. Le mécanisme moléculaire à l'origine de la réduction de l'expression de PCSK9 par la berbérine dépend de HNF1 α . Ainsi, la berbérine induit l'ubiquitination de HNF1 α puis sa dégradation par le protéasome [172]. Dans un contexte d'inflammation induite par

le lipopolysaccharide (LPS), la berbérine prévient l'augmentation des niveaux de PCSK9 et la réduction du LDLr [174]. Le curcumin, obtenue à partir du rhizome du curcuma, est utilisé dans la médecine traditionnelle pour ses vertus hypolipémiantes [175]. L'ajout de 10mM de curcumin à des HepG2 réduit significativement l'expression ARN et protéique de PCSK9 via un mécanisme dépendant de HNF1 α [176]. Le polydatine, aussi connu sous le nom de piceide, est un polyphénol présent dans le raisin possédant des propriétés hypolipémiantes [177]. Le traitement de cellules HepG2 par 20mM de Polydatine réduit significativement les niveaux d'expression de PCSK9 [178].

Rôle central de l'intestin dans le métabolisme lipidique

5.1 Structure de l'intestin

Le tractus digestif est constitué par la succession de l'oesophage, l'estomac, l'intestin grêle puis le colon. Le tractus intestinal est subdivisé en plusieurs sections. Le duodénum tient son nom du grec dodekadaktylo ($\delta\omega\delta\epsilon\kappa\alpha\delta\alpha\kappa\tau\upsilon\lambda\eta$) qui signifie littéralement « mesurant 12 doigts de large » soit environ 26 cm chez l'homme. On retrouve ensuite le jéjunum et l'iléon mesurant au total 2,91m. Enfin, le colon, constituant la dernière section du tractus digestif, mesure 1,9m. Le diamètre interne du tractus intestinal varie de 2 à 4,8 cm. La présence de villosités sur la face interne du tractus intestinal et de microvillosités à la surface apicale des entérocytes augmente la surface d'échange entre l'intestin et la lumière. En effet, dans la zone jéjuno-iléale, les villosités augmentent cette surface par 6,5 et les microvillosités par 13, leur conférant, ainsi, une meilleure capacité d'absorption (figure 5.1) [179].

Une étude récente, a remis à jour les mesures de longueurs et de surfaces des différents segments du tractus intestinal (figure 5.1) [179]. Elle démontre, dans un premier temps, que la surface totale du tractus intestinal, est 10 fois inférieure à ce qui est généralement admise. Ainsi, la croyance populaire associant la surface intestinale à celle d'un court de tennis soit environ 300 m² a été largement surévaluée puisque sa valeur réelle s'approche plutôt des 30 m². Selon cette étude, la méthode de mesure impliquant l'introduction d'une sonde, expliquerait cette différence d'un facteur 10 [179]. Par comparaison, chez la souris, la surface de l'épithélium intestinal est de 1,41 m². Les variations de longueur et le nombre de villosités confèrent aux segments de l'intestin des capacités d'absorption différentes (figure 5.1). En effet, les segments jéjunaux et iléaux représentent 30 m² soit 84% de la

surface épithéliale intestinale. Le duodénum et le colon représentent respectivement $2,9 \text{ m}^2$ et $1,9 \text{ m}^2$ de surface épithéliale.

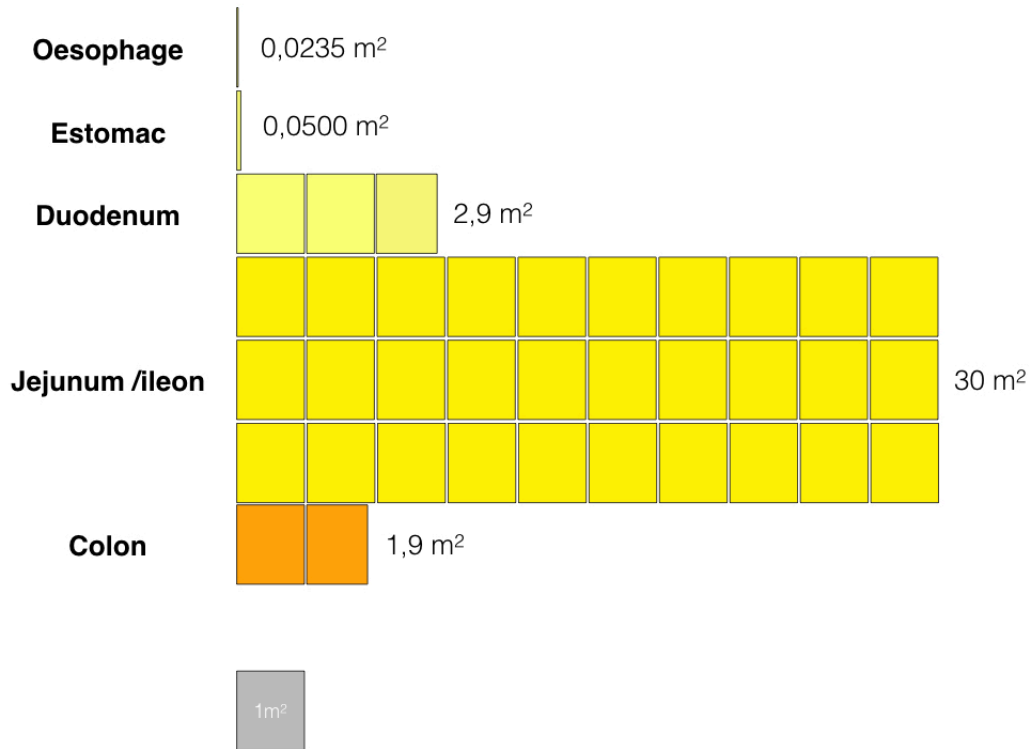


FIGURE 5.1 – Représentation des surfaces des différentes zones du tractus digestif (adapté de Helander HF 2014)

La paroi intestinale est composée de 4 feuillets : la muqueuse, la sous muqueuse, les couches musculaires et la tunique externe (figure 5.2) [180]. L'épithélium constitue la muqueuse, fait face à la lumière intestinale et repose sur une couche de tissu conjonctif appelée lamina propria ou chorion. Au niveau de ce tissu conjonctif, des capillaires acheminent le sang depuis l'artère mésentérique. On retrouve également des vaisseaux chylifères dont le rôle est de transporter les chylomicrons nouvellement produits vers la circulation générale en passant par la veine sous-clavière. Le chorion repose sur une fine couche musculaire qui la sépare de la sous muqueuse. Le feuillet sous muqueux comprend un plexus ganglionnaire nerveux appartenant au système nerveux entérique, le plexus sous-muqueux, responsable du contrôle de la sécrétion intestinale. On retrouve, ensuite, deux feuillets musculaires, un premier composé de fibres musculaires circulaires suivi d'un second contenant des fibres musculaires longitudinales. Entre ces deux couches musculaires se situe un second plexus nerveux, le plexus myentérique, régulant la motricité intestinale. Enfin, une tunique ex-

terne, appelée séreuse, constitue le dernier feuillet.

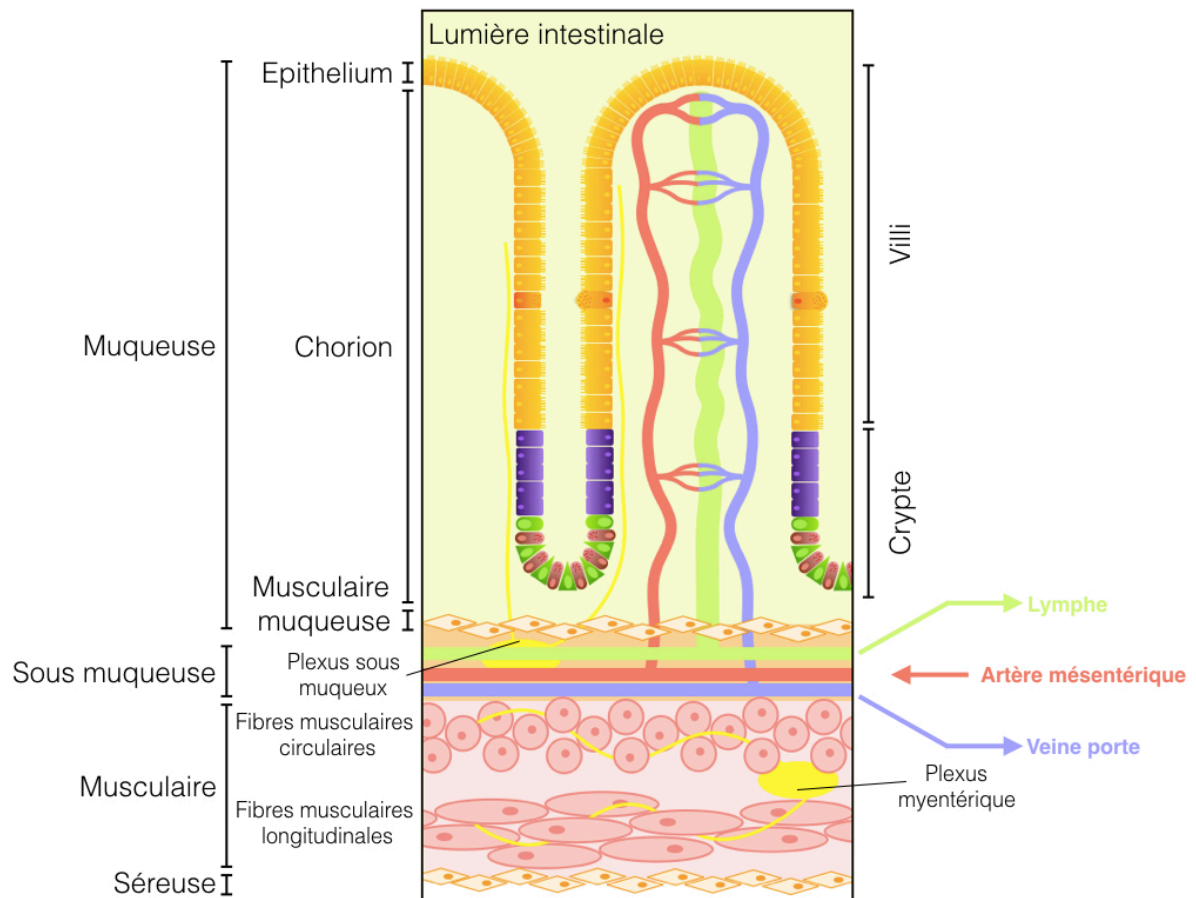


FIGURE 5.2 – Schéma des feuillets composants l'intestin

L'épithélium digestif est formé par une succession de cryptes et de villosités permettant ainsi à l'intestin d'optimiser sa surface d'échange avec la lumière. Les cryptes sont peuplées de cellules souches intestinales et de cellules en cours de différenciation (figure 5.2). Les villosités regroupent les cellules intestinales différenciées. Dans des conditions physiologiques, il se crée un équilibre entre la production de nouvelles cellules par les cellules souches dans la crypte et la desquamation des cellules vieillissantes au sommet des villosités. Une fois produites, à partir des cellules souches intestinales, les cellules migrent le long de la villosité tout en continuant leur maturation et ce durant 4 à 5 jours [181]. Les cellules souches localisées dans la crypte constituent une niche. Une majorité d'études s'accordent autour du nombre de 4 à 6 cellules souches par crypte [182]. Deux populations différentes de cellules souches coexistent dans les cryptes. On distingue les cellules à renouvellement rapide de celles au renouvellement plus lent [183]. Les cellules souches à renouvellement rapide sont localisées dans la partie basse de la crypte, tout au long du tractus intestinal, en alternance avec des cellules de Paneth. Ces cellules, qualifiées de cel-

lules souches actives (aISC), expriment à leur surface des marqueurs spécifiques tels que LGR5, sox9 et Bmi1 [184] [185]. Le marqueur LGR5 a été identifié en 2005 par l'équipe d'Hans Clever et constitue le seul marqueur spécifiquement retrouvé dans les aISC. En 2015, l'équipe de Scott Magness, identifie un second marqueur, Sox9, exprimé à la fois par les aISC, les cellules de réserve (rISC) ainsi que par une population de cellules intestinales différenciées, les cellules entéroendocrines. La seconde population de cellules souches est qualifiée de rISC et est localisée au dessus des aISC. Ces cellules sont beaucoup plus rares, à la fois dans les cryptes ainsi qu'à l'échelle de l'organe puisqu'elles ne sont présentes que dans la partie proximale de l'intestin [186]. Ces cellules expriment certains marqueurs en commun avec les aISC tels que Sox9 et Bmi1. Les cellules aISC, sous l'action de facteurs de différenciation vont produire 4 populations de cellules différenciées : les entérocytes, les cellules caliciformes, les cellules entéroendocrines et les cellules de Paneth.

Les entérocytes, constituant la population la plus abondante, représentent 90% des cellules intestinales [187]. Le rôle de ces cellules dans l'absorption est conditionné par la présence de nombreuses microvillosités sur leur pôle apical. Les cellules caliciformes, aussi connues sous le nom de cellules de Goblet, représentent environ 8% de la population cellulaire intestinale. Leur nombre augmente tout au long du tractus intestinal, représentant 4% dans le duodénum, et 16% dans le colon [188]. La capacité à sécréter la mucine, composant essentiel du mucus, leur confère un rôle dans la protection de l'intestin contre les pathogènes présents dans la lumière.

Bien qu'elle ne représente qu'un pour-cent de la population cellulaire intestinale, il existe une très grande variété de cellules entéroendocrines [189]. On dénombre ainsi 15 sous-populations de cellules entéroendocrines. On retrouve, par exemple, les cellules entéroendocrines produisant la sécrétine (cellule S), favorisant la sécrétion d'enzymes digestives par le pancréas. La cholecystokinine, produite par les cellules I, impact également sur la digestion en stimulant le relargage des enzymes digestives par la vésicule biliaire. Le transit intestinal est également modulé par des sécrétions de cellules entéroendocrines de type N (neurotensine). À l'inverse, PYY (pour peptide YY) est sécrété par les cellules L et ralentit le transit intestinal [190]. Enfin, les cellules de paneth présentent la particularité d'être les seules cellules différenciées dont la migration, au cours de leur maturation, se fait dans le sens inverse, vers le fond de la crypte. Elles présentent également une durée de vie trois fois plus longue en comparaison des autres cellules différenciés. Leur fonc-

tion, dans l'immunité innée, est due à leur capacité à sécréter du lysosome, des peptides antimicrobiens tels que la défensine.

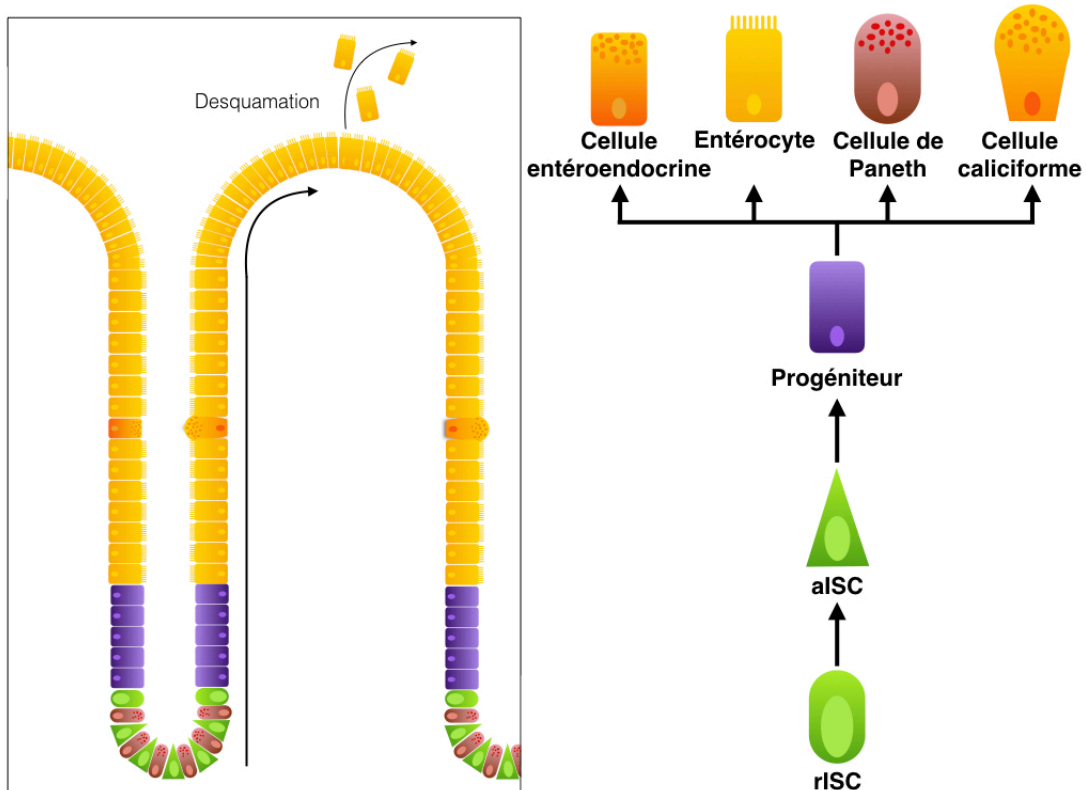


FIGURE 5.3 – Représentation des populations cellulaires composant l'épithélium digestif

5.2 Digestion des lipides

Les triglycérides, les phospholipides et le cholestérol sont quantitativement les principaux lipides présents dans l'alimentation. Deux étapes préliminaires sont nécessaires à l'absorption des lipides par les entérocytes : leur digestion puis leur solubilisation sous forme de micelles.

Les triglycérides constituent la forme majoritaire de lipides retrouvés dans l'alimentation [191]. La conversion des triglycérides (TG) en acides gras (AG) et en monoglycérides (MAG) commence dans l'estomac pour finir dans le duodenum et dans la partie proximale du jejunum où leur absorption est majoritaire. Cette étape est réalisée par la lipase linguale, gastrique et pancréatique. L'hydrolyse des TG produit deux AG et un MAG. Le MAG issu de l'hydrolyse des TG peut également être converti en un AG et un glycerol. Cependant la majorité des MAG présents dans la lumière intestinale est absorbée sans

être préalablement hydrolysée [192].

Les phospholipides représentent 1 à 10% de la totalité des lipides absorbés quotidiennement [193]. La phosphatidylcholine représente le phospholipide le plus abondant dans l'alimentation [194]. La phosphatidylcholine présente dans l'intestin à deux origines : l'alimentation et la bile. La digestion par la PLA2 de la phosphatidylcholine en acide gras et en 2-lysolecithin intervient dans le duodenum [195]. L'activité de la phospholipase A2 dépend fortement de la présence de sels biliaires [196].

Dans le duodenum, 1/3 du cholestérol provient de l'alimentation [193] et les deux tiers restant de l'efflux biliaire et transintestinal. Chez l'homme, l'absorption intestinale de cholestérol n'est pas totale, en moyenne seulement 50% sont absorbés, le reste étant éliminé dans les fèces [197]. Le cholestérol alimentaire est majoritairement sous sa forme libre, seul 10 à 15% sont estérifiés. Seul le cholestérol sous sa forme libre peut être incorporé dans les micelles pour être ensuite absorbé par l'intestin. L'hydrolyse des esters de cholestérol en cholestérol libre et en acide gras est réalisé par la cholestérol esterase dans le duodenum.

5.3 Micellisation

La face luminale des entérocytes est recouverte d'une fine couche aqueuse immobile qui constitue une barrière physique à l'absorption des lipides du fait de leur nature hydrophobe [198]. L'absorption des produits de l'hydrolyse des TG, des phospholipides et des esters de cholestérol, nécessite donc une étape de solubilisation sous forme de micelles pour permettre le passage de la couche aqueuse et ainsi faciliter leur incorporation par les entérocytes [199]. Le passage de la couche aqueuse bordant les entérocytes, constitue l'étape limitante de l'absorption intestinale des lipides. En l'absence de complexes micellaires, les acides gras s'accumulent dans la lumière intestinale [200]. Dès 1916 et les travaux de Mueller chez le chien, la bile est présentée comme un élément essentiel à l'absorption du cholestérol par l'intestin [201]. Un demi siècle plus tard, des travaux chez le rats montrent que l'absence d'acides biliaires, essentiels à la formation des micelles, s'associe à une baisse massive de l'absorption jéjunale d'acides gras libres [202] et de cholestérol [203] [204]. Le rendement d'absorption des acides gras et du cholestérol est également dépendant de la nature des acides biliaires entrant dans la composition des micelles [204]. Les travaux de Watt et al. montrent que la forme tauro-conjuguée de l'acide cholique est plus efficace que

l'acide tauro-deoxycolique pour l'absorption intestinale de cholestérol [204]. Le nombre de groupements hydroxyles semble également influencer l'absorption intestinale de cholestérol. Ainsi, les acides biliaires trihydroxylés, tels que l'acide cholique, sont associés à une meilleure absorption du cholestérol en comparaison des acides biliaires dihydroxylés, tel que l'acide deoxycholique [205] [206].

5.4 Absorption intestinale des lipides

5.4.1 Absorption intestinale des AG

L'absorption intestinale des acides gras est un processus très efficace (95%) mais qui reste à ce jour très mal caractérisé (Figure 5.4).

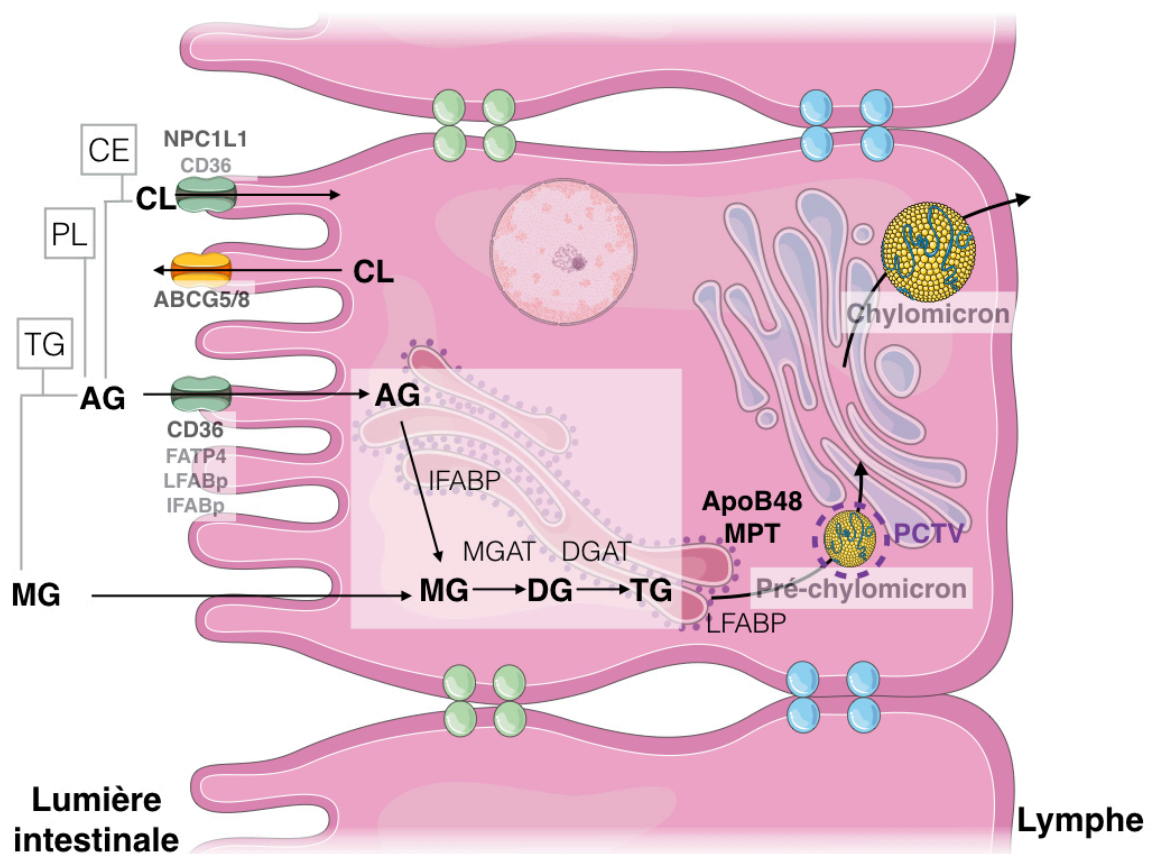


FIGURE 5.4 – Représentation schématique de la prise en charge des lipides par l'entérocyte.

CD36 (humain)/FAT(rat)

CD36 est une protéine transmembranaire ubiquitaire de 80 kDa [207]. Le rôle de CD36 dans l'internalisation des acides gras a été identifié pour la première fois en 1993 dans

l'adipocyte [207] puis dans le muscle [208]. De nombreuses études, sur des modèles de déficience en CD36, chez l'Homme [209] [210] [211] et la souris [212] [213] ont confirmé le rôle de CD36 dans l'internalisation et le métabolisme des acides gras. Sa localisation dans la partie proximale de l'intestin au niveau de la bordure en brosse des entérocytes en a donc fait un candidat idéal pour l'absorption intestinale des acides gras par l'intestin [214] [215] [216]. Cependant, son implication dans l'absorption intestinale des acides gras semble être mineure. En effet, la très haute affinité de CD36 pour les acides gras suggère que le transporteur est rapidement saturé [215]. De plus, différents travaux sur des modèles de souris KO pour CD36 ne montrent aucun défaut d'absorption intestinale des acides gras [217] [218] [219]. Ainsi, Nauli et al montrent, chez des souris CD36 KO, que l'internalisation des acides gras se trouve décalée vers les segments distaux [219]. En revanche, la sécrétion des chylomicrons semble en partie contourner la circulation lymphatique. En effet, l'absence de CD36 s'accompagne d'une réduction de 50% de la sécrétion de chylomicrons dans la circulation lymphatique ainsi que d'une baisse de 35% de la taille de ces particules [219] [218].

FATP4

La Fatty Acid transport Protein 4 (FATP4) est une protéine de 15 kDa localisée dans la bordure en brosse des entérocytes [220]. Son rôle dans l'internalisation des acides gras a été suggéré par l'augmentation de l'internalisation d'acide gras suite à sa surpression dans un modèle HEK 293. De plus ces mêmes travaux ont montré une baisse de l'internalisation des AG en réponse à une inhibition de l'expression de FATP4 par des oligonucléotides antisens dans un modèle d'entérocytes murins [220]. Cependant, son implication *in vivo* dans l'absorption intestinale des AG semble mineure. Un KO total pour FATP4 étant létal, en raison de son absence dans l'épiderme, Shim et al. ont développé un modèle KO murin dont l'expression est maintenue uniquement dans l'épiderme. Ils ont ainsi montré que ces animaux ne présentaient aucune différence d'absorption intestinale d'AG [221].

FABPpm

Il existe deux isoformes de la Fatty Acid Binding Protéines dans l'intestin : LFABP (Liver) et IFABP (Intestine) [222]. LFABP, identifiée dans un premier temps au niveau hépatique, est l'isoforme la plus abondante dans l'intestin [223] [224]. Au sein du tractus

digestif, ces deux isoformes sont principalement trouvées dans le duodénum et le jéjunum [225] [226]. IFABP et LFABP sont capables de fixer respectivement 1 et 2 AG [227]. Le rôle de ces deux isoformes dans l'internalisation des AG a été suggéré par les travaux de Alpers et al [228]. Ainsi, la formation du complexe FABP-AG est plus fréquente quand les AG sont ajoutés dans le milieu apical plutôt qu'en basolatéral. De plus, la localisation de ces deux protéines est régulée par le statut nutritionnel. Pendant l'état postprandial, ces dernières vont être trouvées dans le cytosol. En revanche, à jeun, IFABP et LFABP se délocalisent au niveau apical des entérocytes [228]. Cependant, la génération récente de double KO pour LFABP et IFABP minore leur rôle dans l'absorption intestinale des AG [229].

Transport passif/ actif?

Le mode d'internalisation des AG est sujet à controverse. Ainsi, la nature lipophile des AG leur permettrait de diffuser à travers la membrane plasmique. Alors que leurs rôles multiples suggèrent plutôt une internalisation qui pourrait être modulable et donc dépendante de transporteurs. Des travaux, datant des années 60, sur des intestins de hamsters, montrent que l'absorption des AG est possible aussi bien à 0°C qu'à 37°C, suggérant un mode de transport passif indépendant de protéines transmembranaires [230] [231]. Cependant, Trotter et al montrent, sur une lignée cellulaire tumorale d'origine humaine nommée CACO2, que l'internalisation des AG par ces cellules est un phénomène saturable [232]. Ces résultats suggèrent, ainsi, l'existence de transporteurs facilitant le passage des AG au travers de la membrane plasmique des entérocytes. Des mesures d'absorption intestinale d'AG chez le rat, suggèrent que les deux modes d'internalisation coexistent et dépendent de la concentration luminale en acide gras [233]. Ainsi, des concentrations d'AG de l'ordre du μM vont présenter un profil d'absorption saturable, suggérant un mécanisme d'absorption actif dépendant de transporteurs. À l'inverse, des concentrations plus importantes de l'ordre du mM présentent un profil d'absorption linéaire suggérant un mode d'absorption passif [233].

5.4.2 Absorption intestinale du monoacylglycerol

A l'instar des AG, le mode d'absorption du monoacylglycerol (MG) est également sujet à controverse (figure 5.4). Les travaux de Schulthess G et al. montrent que l'internalisation

des MG est possible à faible température et rapidement, suggérant que l'internalisation des MG est un processus passif [234]. Cependant, des études récentes suggèrent plutôt une absorption dépendante de protéines transmembranaires. Il a ainsi été montré que l'internalisation des MG était un phénomène saturable et sensible à l'ajout de trypsine [235] [236]. Enfin, l'absorption des AG et des MG pourrait être réalisée par un transporteur commun. En effet, LFABP est également capable de fixer les MG [237]. De plus, l'internalisation des MG semble inhiber celle des AG [235].

5.4.3 Absorption intestinale du cholestérol

Le cholestérol présent dans la lumière intestinale provient de trois sources principales : l'alimentation, l'efflux biliaire et l'efflux transintestinal [238] [239]. Seul le cholestérol d'origine animale est absorbé par l'intestin [240]. Dans des conditions physiologiques, les phytostérols, dont le beta sitostérol est la forme la plus abondante, sont internalisés par les entérocytes *via* NPC1L1 (pour Nieman Pick C1 like 1) et rejetés immédiatement par les transporteurs ABCG5/G8 (pour ATP Binding Cassette sub family G member 5 et 8) [241]. L'absorption intestinale de cholestérol ne permet d'en absorber qu'environ 50%. Ainsi, les niveaux circulants de cholestérol sont majoritairement d'origine hépatique [242]. De nombreux travaux suggèrent que ce transport est un mécanisme actif dépendant de protéines transmembranaires. Ainsi, les différences en terme d'efficacité d'absorption intestinale de cholestérol inter-individuelle réduisent la possibilité d'une diffusion passive du cholestérol [243] [244]. De plus, l'hypothèse d'un transport actif a été renforcée par l'identification de mutations de protéines transmembranaires provoquant une modulation de l'absorption intestinale de cholestérol [245] [246] [247] [248]. Enfin, la découverte d'agents pharmacologiques capables de bloquer l'absorption intestinale de cholestérol suggère fortement l'existence d'un transport actif [249]. Trois protéines clefs, responsables de l'absorption intestinale de cholestérol, ont ainsi été identifiées : NPC1L1, ABCG5 et ABCG8 (Figure 5.4).

NPC1L1

La protéine NPC1L1, est une protéine transmembranaire capable de fixer les stérols et présente une forte homologie avec la protéine NPC1 dont elle tient son nom [250] [245][251]. NPC1L1 est abondamment exprimée dans la bordure en brosse des entéro-

cytes [252]. La distribution de NPC1L1 varie en fonction des espèces. Chez la souris, on la retrouve exclusivement dans l'intestin [253] [245]. En revanche, chez les primates, dont l'homme, elle est exprimée aussi bien dans l'intestin que dans le foie [254] [255]. En 2004, Altmann et al caractérisent le rôle de NPC1L1 dans l'absorption intestinale de cholestérol. A l'aide de souris déficientes en cette protéine, ils montrent que NPC1L1 semble responsable de l'absorption d'environ 70% de cholestérol radiomarqué gavé [245]. L'expression ainsi que l'activité de NPC1L1 peuvent être modulées. L'ezetimibe, hypolipémiant connu depuis 1998, a été, quelques années plus tard, identifié comme un inhibiteur de NPC1L1 [256] [249]. De nombreuses études associent la prise d'ezetimide à une baisse de la cholestérolémie supérieure à 50% chez la souris et à 20% chez l'homme [257] [258] [259] [260] [261]. Les fénofibrates, molécules appartenant à la classe des fibrates, réduisent l'absorption intestinale de cholestérol en diminuant l'expression de NPC1L1 *via* un mécanisme dépendant du récepteur nucléaire PPAR α [262]. L'activation d'un second récepteur nucléaire, PPAR δ , réduit l'expression de NPC1L1 s'associant à une baisse de 43% de la cholestérolémie [263]. Le facteur de transcription CREBH (pour cyclic AMP–responsive element–binding protein H) est abondamment exprimé dans l'intestin et semblerait réguler l'expression de NPC1L1 [264]. Ainsi, la sur-expression de CREBH chez la souris s'accompagne d'une baisse significative de la cholestérolémie, s'associant à une réduction de l'expression de NPC1L1. À l'inverse, la suppression de CREBH génère une hypercholestérolémie corrélée à une hausse de l'expression de NPC1L1. Il est intéressant de noter que les niveaux intracellulaires de cholestérol régulent également la localisation de NPC1L1 [265] [254]. Ainsi, la déplétion du cholestérol intracellulaire provoque une re-localisation du transporteur du milieu intracellulaire à la membrane plasmique. L'expression de NPC1L1 est également régulée par les statines [266]. En effet, la réduction intracellulaire de cholestérol, induite par les statines, stimule l'expression de NPC1L1 *via* SREBP2 et HNF-4 α .

ABCG5/G8

Les protéines ABCG5 et ABCG8 fonctionnent en hétérodimères et partagent un promoteur commun [267] [246]. ABCG5/8 sont fortement exprimées dans la bordure en brosse des entérocytes et dans les hépatocytes [268] [267] [269]. Elles fonctionnent, à la différence de NPC1L1, en transportant les stérols à l'extérieur de la cellule. Ainsi, une sur-expression d'ABCG5/G8 entraînera, chez la souris, une baisse de l'absorption intestinale de choles-

térol [241]. À l'inverse, une diminution de leur expression provoque une baisse de l'absorption intestinale de cholestérol [270]. En revanche, cette même baisse d'expression aura des conséquences opposées sur les sitostérols en augmentant leur concentration plasmatique d'un facteur 30 [270]. Une alimentation riche en stérols induit une augmentation de l'expression d'ABCG5/G8 dépendant de l'activation du récepteur nucléaire LXR α et LRH-1 [268] [271]. De plus, une alimentation riche en gras mais dépourvue de cholestérol induit une baisse significative de l'expression d'ABCG5/8 indépendante de LXR. La mutation d'un des deux gènes codant pour ABCG5 et G8 entraîne une augmentation des niveaux plasmatiques de phytostérols [272]. Chez les patients souffrant de sitostérolémie, 15 à 60% des phytostérols sont absorbés par l'intestin. Une fois dans le plasma, les phytostérols se fixent aux parois des vaisseaux et participent ainsi à l'augmentation des risques cardiovasculaires.

CD36/SRB1

La localisation de CD36 et SRB1 dans la bordure en brosse des entérocytes et leur rôle dans l'internalisation des AG en font des acteurs potentiels dans l'absorption intestinale du cholestérol. Ainsi, une surexpression de SRB1 chez la souris induit une nette augmentation de l'absorption intestinale de cholestérol et d'AG [273]. De plus, l'expression de SRB1 dans un modèle de cellules COS-7 leur confère des propriétés proches de celles des entérocytes concernant l'absorption intestinale de cholestérol [274]. Cependant, la génération de modèles KO pour SRB1 ne modifie pas l'absorption intestinale de cholestérol [275] [276] [277] [274]. Le rôle de CD36 dans l'internalisation de cholestérol semble moins hypothétique que celui de SRB1. Ainsi, une surexpression de CD36 dans des cellules COS-7 induit une augmentation de l'internalisation de cholestérol [274]. De plus, la suppression de CD36 chez la souris s'accompagne d'une baisse de l'absorption intestinale du cholestérol [219].

Une fois internalisés, les acides gras, les monoacyles gras et le cholestérol vont être incorporés dans les chylomicrons pour être ensuite sécrétés dans la circulation lymphatique. Les entérocytes étant polarisés, la face par laquelle les AG vont être incorporés va décider de leur devenir [278] [279] [280]. Ainsi, les AG provenant de la face apicale participeront à la synthèse des TG et à la formation des chylomicrons. Les AG issus de la circulation sanguine et incorporés depuis la face basolatérale, seront destinés à être oxydés et à servir

de substrat pour la synthèse de phospholipides. L'accumulation d'AG et d'Acyl-coenzyme A (acyl-CoA) peut devenir létale pour la cellule [281] [282] [283] [284]. La fixation des AG et des acyl-CoA à des protéines puis leur conversion en TG vont permettre de limiter les conséquences délétères dues à l'accumulation d'AG et d'acyl-CoA dans la cellule. Ainsi, la L-FABP préférentiellement, va se fixer aux AG et aux acyl-CoA puis les adresser au reticulum endoplasmique (RE) [285]. Le cholestérol libre nouvellement absorbé est re-estérifié par l'acyl CoA :cholest'rol acyltransférase (ACAT1 et 2) et transféré dans le RE [286]. Chez la souris et le singe ACAT1 est ubiquitaire et ACAT2 est principalement exprimée dans le foie et l'intestin [287] [288].

C'est au sein du RE que va avoir lieu la biosynthèse de TG (figure 5.4). Les MAG sont, dans un premier temps, acétylés par la monoglycérade acyltransférase (MGAT) afin de former du diacylglycerol. Chez la souris, MGAT2, une des trois isoformes de MGAT, est spécifiquement exprimée dans l'intestin [289]. Chez l'homme, c'est l'isoforme 3 qui est principalement retrouvée dans l'intestin, en particulier dans l'iléon [290].

5.5 Absorption intestinale des acides biliaires

L'absorption des acides biliaires a lieu principalement dans l'iléon [291]. Bien que le transport actif des acides biliaires dépendant de transporteurs est majoritaire, leur diffusion passive est également possible [292]. Ainsi, les acides biliaires non conjugués, présents en minorité, diffusent passivement à travers la membrane des entérocytes tout au long du tractus digestif. A l'inverse, les formes conjuguées sont internalisées *via* des transporteurs principalement dans l'iléon. L'absorption intestinale des acides biliaires est un processus très efficace puisque seulement 5% des acides biliaires échappent à l'absorption et sont excrétés dans les fèces [293]. Deux transporteurs ont été décrits être impliqués dans l'internalisation des acides biliaires par les cellules intestinales : le transporteur des anions organiques (OATP) et le transporteur apical des acides biliaires dépendant du sodium (ASBT). Il existe plusieurs isoformes du transporteur OATP chez l'homme (OATP1A2 et OATP2B1) et la souris (OATP1A4, OATP1A5 et OATP2B1) localisées dans la bordure en brosse des entérocytes[294]. Cependant, le rôle du transporteur OATP dans l'internalisation des acides biliaires semble mineur. En effet, la délétion du transporteur OATP s'associe a une forte augmentation des niveaux circulants d'acides biliaires, ce qui sug-

gère plutôt un rôle dans l'internalisation des acides biliaires par le foie plutôt que par l'intestin[295]. ASBT est localisé principalement dans la partie distale de l'iléon. Son rôle dans l'absorption intestinale des acides biliaires a été caractérisé par le développement de souris KO pour ASBT qui présentent une sévère malabsorption des acides biliaires[296]. De plus, chez l'homme, une mutation sur le gène codant ASBT entraîne une diminution importante des niveaux circulants d'acides biliaires primaires[297][298]. Le transport des acides biliaires au sein des entérocytes est mal connu. Des travaux suggèrent cependant que ce transport ne nécessite pas l'intervention de vésicules[299]. La protéine IBABP, connue pour se fixer aux acides gras, est capable de fixer les acides biliaires avec une plus grande affinité[300]. Le rôle d'IBABP dans le métabolisme des acides biliaires est renforcé par la distribution tissulaire semblable de IBABP avec ASBP et OST α et β , responsable de l'efflux des acides biliaires de l'entérocyte. L'affinité d'IBABP pour les acides biliaires dépend de la nature de ces derniers. Ainsi, IBABP interagit préférentiellement avec les acides biliaires dihydroxylés tels que le CDCA et le DCA, comparé à l'acide cholique (CA) et le LCA respectivement tri et mono-hydroxilé. De la même façon, les acides biliaires tauro-conjugués sont favorisés au détriment des formes glycoconjuguées [301]. Enfin, des études sur des explants jéjunaux montrent que la délétion d'IBABP chez la souris, altère le transport des formes tauroconjuguées. Cependant, *in vivo*, la réduction de l'absorption d'acides biliaires est observée uniquement chez les mâles [302]. L'efflux des acides biliaires des entérocytes vers le compartiment plasmatique est supporté par 3 protéines : les transporteurs OST α et β , le transporteur ATP binding cassette 3 (ABCG3). Les transporteurs OST α et β , dont l'expression est majoritaire dans l'iléon, fonctionnent en hétérodimères [62]. La génération de souris déficientes en ce transporteur a permis de révéler son rôle majeur dans l'excrétion des acides biliaires de la cellule. Ainsi, la délétion d'OST α et β s'accompagne d'une réduction de l'absorption caractérisée par une augmentation de l'excrétion fécale d'acides biliaires [303] et par une accumulation des acides biliaires dans les tissus intestinaux [304]. Un rôle de l'hétérodimère dans l'internalisation des acides biliaires a été suggéré par la découverte de la capacité de ce transporteur à réaliser un transport bidirectionnel [304]. Cependant ce rôle semble mineur puisqu'une augmentation des niveaux circulants plasmatiques d'acides biliaires, chez la souris et chez l'humain, n'augmente pas l'expression des gènes cibles intestinaux du récepteur nucléaire activé par les acides biliaires FXR [305] [306]. Plusieurs travaux en 2000 suggèrent que

le transporteur ABCB3, aussi connu sous le nom de MRP3, serait impliqué dans l'efflux des acides biliaires. En effet, sa localisation basolaterale au sein de la membrane des entérocytes en fait un candidat potentiel. Cependant son rôle dans l'efflux d'acides biliaires semble être mineur. Ainsi, son absence, chez la souris sous régime classique, n'a pas de conséquence sur l'absorption intestinale des acides biliaires [307] [308]. Cependant, les souris déficientes en MRP3 soumises à un régime enrichi en CA, présentent une réduction d'absorption intestinale des acides biliaires [309].

5.6 Métabolisme luminal des stérols

Dans la lumière intestinale, une partie des acides biliaires est métabolisée par les bactéries présentes dans l'intestin formant le microbiote intestinal. Les acides biliaires primaires vont ainsi subir une série de transformations aboutissant à leur conversion en acides biliaires secondaires. La grande diversité bactérienne de l'intestin conditionne une multitude de modifications comprenant la dé-conjugaison, l'oxydation, l'épimérisation, la déhydroxylation, l'estérification et la désulfatation [310]. La dé-conjugaison consiste en l'hydrolyse, par l'hydrolase des acides biliaires (BSH), de la liaison entre le carbone et le groupement taurine ou glycine en position 24. La dé-conjugaison pourrait être un moyen pour certaines bactéries de récupérer des carbones, de l'azote ainsi que du soufre. La dé-conjugaison serait également un mécanisme de défense développé par le microbiote afin de réduire les effets délétères des acides biliaires. Il a, en effet, été montré que la dé-conjugaison favorise la prolifération bactérienne [311]. L'oxydation, réalisée par la dehydrogénase hydroxystéroïde des acides biliaires (HSDH), repose sur la conversion des groupements hydroxyles en oxygène. L'épimérisation correspond au changement de configuration d'un groupement hydroxyle et nécessite l'action successive de deux épimères de l'HSDH différents : un alpha puis un beta ou l'inverse. Bien que la formule brute de la molécule obtenue à l'issue de l'épimérisation soit identique, ses propriétés sont en revanche différentes. Ainsi, l'UDCA, l'épimère du CDCA, n'active pas FXR contrairement au CDCA [312]. La réaction de déhydroxylation consiste à substituer le groupement hydroxyle par un hydrogène. Cette modification est la plus abondante et conduit à la formation du DCA et du LCA respectivement à partir du CA et du CDCA. Dans les fèces, 10 à 30% des acides biliaires sont estérifiés. L'absence de ces formes dans la bile suggère

qu'ils sont générés par le microbiote [310]. Cette réaction repose sur l'ajout d'un groupement ester sur le carbone 24. L'ajout d'un groupement sulfate sur les acides biliaires, par l'action de la sulfotransférase dans le foie, favorise l'élimination des acides biliaires en réduisant leur absorption [313]. La désulfatation des acides biliaires consiste au retrait du groupement sulfate en position C-3. Le cholestérol présent dans la lumière est également métabolisé par le microbiote intestinal. En 1974, Kellogg TF et al notent la présence, en quantité importante, de cholestérol n'ayant subi aucune modification dans les fèces de rat dont le microbiote intestinal a été éliminé [314]. Bien que le cholestérol soit principalement converti en coprostanol, on retrouve également dans les fèces du cholestanol et du coprostanone [315]. La capacité de convertir le cholestérol semble surtout dépendre de la nature du microbiote et de la quantité de bactéries qui le compose [316] [317]. Il existe ainsi 2 profils de conversion : les individus qui vont convertir la quasi totalité du cholestérol présent dans la lumière intestinale et d'autres qui auront une capacité de conversion réduite (Figure 5.5). Deux voies de conversion du cholestérol ont été identifiées [318]. Une voie directe, reposant sur la conversion du cholestérol en coprostanol, qui n'implique pas de formes intermédiaires. Une seconde, faisant intervenir plusieurs formes intermédiaires dont le coprostanone, semble être privilégiée du fait de la présence de ces intermédiaires dans les fèces [310].

Le coprostanol est peu absorbé au niveau intestinal, faisant ainsi de la conversion du cholestérol en coprostanol une cible d'intérêt pour lutter contre l'hypercholestérolémie [319]. Plusieurs études ont tenté d'identifier les populations bactériennes responsables de la production de coprostanol. Ainsi, les souches *Lactobacilli Casei* et *Bacteroides Dorei* ont été isolées et identifiées comme favorisant la conversion du cholestérol en coprostanol [320] [321].

5.7 Production des chylomicrons

La production de chylomicrons, mécanisme en 2 étapes [322], commence dans le RE par la translocation de l'ApoB 48 dans la lumière du RE [323] [324]. L'apoB48 est la protéine structurante des chylomicrons [325]. Elle est issue de l'épissage alternatif, dépendant de l'apoBec1, du gène de l'apolipoprotéine B (commun à l'apoB100 et 48) [326]. L'apoB48 correspond ainsi à la transcription de 48% du gène total de l'apoB. L'inactivation du

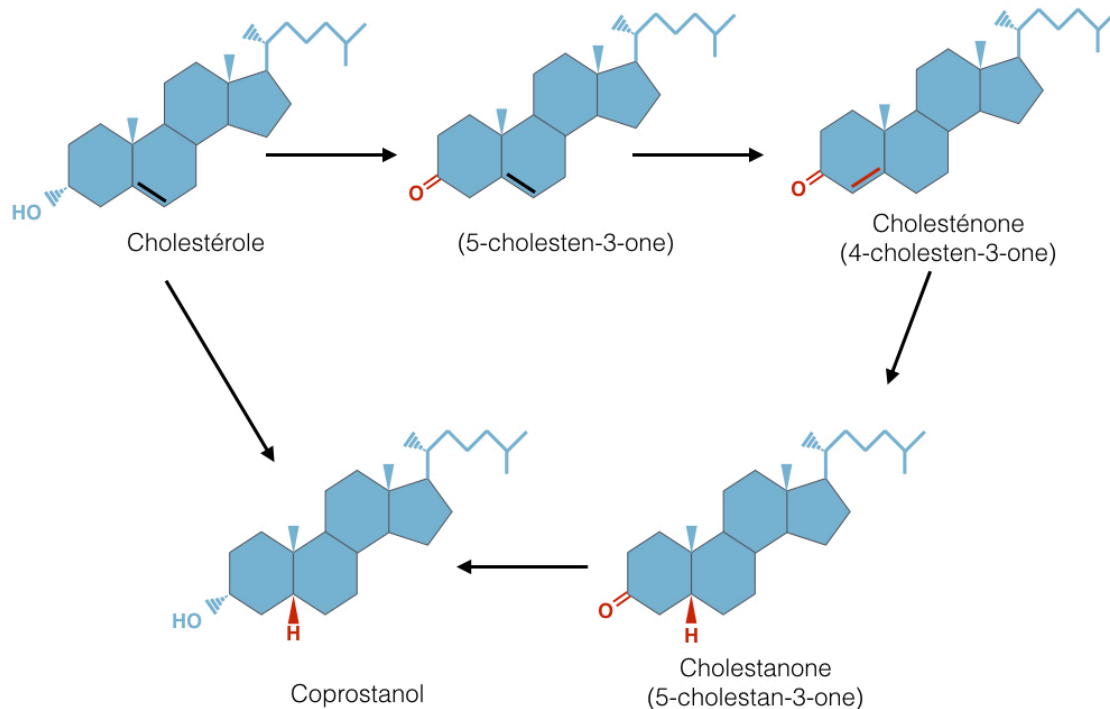


FIGURE 5.5 – Représentation des voies de synthèse du coprostanol (adapté de Gérard P, 2014)

gène de l'APOBEC1 aura pour conséquence la production uniquement d'apoB100 par l'intestin et une baisse de la synthèse de chylomicrons [327]. Il a été rapporté qu'une partie des ARN de l'apoB échappe à l'épissage alternatif, générant ainsi la sécrétion d'une petite quantité d'apoB100 par l'intestin [328]. La partie N-terminale de l'apoB48 contient un site de fixation pour la microsomale transfer protein (MTP) [329]. La MTP est impliquée dans différentes étapes de la production de chylomicrons. La fixation de la MTP sur l'apoB48, nouvellement synthétisée, empêche sa dégradation précoce due à sa forte insolubilité [330]. De plus, la MTP recrute différents lipides telles que les TG, le cholestérol libre et estérifié ainsi que les phospholipides afin de former un pré-chylomicron [331]. Une fois l'apoB48 entièrement traduite, la protéine se désolidarise de la membrane du RE pour venir fusionner avec une particule riche en lipides. Cette fusion induit l'enrichissement du pré-chylomicron en TG et en ester de cholestérol. Une seconde protéine, l'apoAIV, va s'ajouter à l'apoB48 sur le pré-chylomicron. Bien que son rôle reste mal caractérisé, des études ont montré que sa surexpression augmente la taille des chylomicrons [332] [333] [334] [335]. A ce stade, le pré-chylomicron, qui ne compte qu'une seule apoB48 par

particule, riche en TG et en ester de cholestérol se situe dans la lumière du RE près à être exporté vers le Golgi [336]. La voie classique de transport entre le RE et le Golgi implique le recrutement d'un complexe, appelé COPII, composé de 5 protéines du cytosol : SAR1, SEC23, SEC24, SEC13 et SEC31. La taille des pré-chylomicrons étant 10 fois supérieure à celle du complexe COPII, respectivement 10 000 Å et 1 000 Å, Stagg SM et al suggèrent que le transport des pré-chylomicrons empreinte une voie alternative au complexe COPII [337]. Ainsi, Siddiqi et al. ont identifié un nouveau type de vésicules de transport pour les pré-chylomicrons (PCTV) (figure 5.4) [338]. Plusieurs caractéristiques en font un candidat idéal pour le transport des pré-chylomicrons du RE au Golgi. En effet, la production de ces vésicules, dont la taille est suffisante pour contenir les pré-chylomicrons, dépend de la prise alimentaire. De plus, on retrouve au sein des PCTV des protéines spécifiques des chylomicrons telles que l'apoB48 et l'apoAIV. Enfin, les PCTV sont capables de fusionner avec la membrane du Golgi [339]. Le PCTV est composé de différentes protéines comme CD36, FABP1 qui permet le bourgeonnement à partir du RE et Vamp7 favorisant la fusion avec le Golgi. Il est intéressant de noter que le PCTV contient également certaines protéines trouvées dans le complexe COPII [339] [340]. Une fois dans la lumière du Golgi, les pré-chylomicrons subissent une série de modifications. La protéine ApoA1 va venir se fixer au pré-chylomicron [339]. Ensuite, l'apoB48, protéine abondamment glycosylée dans le RE, voit les mannoses, présents au sein des groupements glycosylés, être substitués par d'autres carbohydrates, la rendant ainsi résistante à l'endoglycosidase H (Endo-H) [341]. La MTP est également présente dans le Golgi, suggérant un enrichissement possible de TG dans les pré-chylomicrons au sein du Golgi [342]. Cependant, cet enrichissement en TG, s'il est avéré, semble mineur car la taille des pré-chylomicrons dans les PCTV et celle des chylomicrons matures est similaire [338]. Les chylomicrons matures sont ensuite transportés, plusieurs à la fois, par des vésicules vers la membrane plasmique sur la face basolatérale des entérocytes pour être ensuite excrétés [343].

5.8 Métabolisme des chylomicrons

Une fois sécrétés dans la circulation par les entérocytes, les chylomicrons vont s'enrichir d'apoC2, d'apoC3 et d'apoE [344] [345]. Le principal rôle des chylomicrons consiste à distribuer les lipides à différents tissus dont les muscles squelettiques, le coeur et le tissu

adipeux [346] [347]. Cette étape nécessite l'action de la lipoprotein lipase (LPL). La LPL est sécrétée par les cellules du parenchyme vasculaire en particulier celles localisées au niveau du cœur des muscles squelettiques et du tissu adipeux [346]. L'activité de la LPL est modulée par l'apoC2 et l'apoC3 associées aux chylomicrons [344]. L'apoC2 va stimuler l'activité de la LPL alors que l'apoC3 l'inhibe. Ainsi, des mutations de l'apoC2, dont la fréquence demeure très rare, vont engendrer une hypertriglycéridémie [348]. À l'opposé, une mutation de l'apoC3 s'associe à une baisse des TG plasmatiques et à une réduction des risques cardiovasculaires [349] [350]. Les travaux de Beigneux A et al. suggèrent l'existence d'un complexe formé de l'association en homodimère de la protéine GPIHBP1, protéine d'ancrage GPI capable de fixer les lipoprotéines de haute densité, facilitant l'interaction entre la LPL et le chylomicron [351]. La génération d'un modèle de souris KO pour GPIHBP1 s'associe à une élévation de la triglycéridémie due à l'accumulation de chylomicron et de VLDL. L'apoA5, en favorisant l'interaction entre le chylomicron et la LPL, apparaît également comme un régulateur de la lipolyse des chylomicrons [352]. L'hydrolyse des TG des chylomicrons par la LPL a pour conséquence de réduire leur contenu en Tg et donc leur taille. Ces chylomicrons résiduels sont captés par le foie, via l'apoA5, limitant leur accumulation aux conséquences néfastes dues à leur nature pro-athérogène [353] [354] [355]. De récentes études ont révélé la capacité de l'intestin à différer la sécrétion des chylomicrons de plusieurs heures [356] [357] [358]. L'intestin peut donc également, comme le tissu adipeux, jouer un rôle de stockage pour les lipides. De la même façon que pour le tissu adipeux, certains signaux vont déclencher la libération des chylomicrons. Ainsi, la prise alimentaire, une stimulation orale mimant un repas, le glucose et le GLP2 vont provoquer la sécrétion de chylomicrons [359] [356] [360] [357].

5.9 Production des HDL

Les lipoprotéines de haute densité (HDL) sont associées à une protection cardiovasculaire [361]. Leur rôle consiste à transporter le cholestérol des tissus périphériques au foie et à l'intestin [362], contribuant ainsi à son élimination de l'organisme. L'apolipoprotéine A1 est la principale protéine des HDL [363]. Une déficience en ApoA1 entraîne une baisse des niveaux circulants de HDL aussi bien chez l'homme [364] que chez la souris [365]. Le transporteur ABC de type A1 (ABCA1) est essentiel à la genèse des HDL. Il

favorise le transfert de cholestérol à l'apoA1 permettant ainsi l'enrichissement du HDL en cholestérol [366]. L'intestin est un des principaux organes producteurs d'apoA1, dont il génère 50% des niveaux circulants [367]. De plus, il exprime abondamment ABCA1 faisant de l'intestin un producteur potentiel de HDL. La génération de souris présentant une déficience intestinale en ABCA1 suggère que 20 à 30% des HDL plasmatiques ont pour origine l'intestin [366]. Ce modèle de souris a également permis de démontrer que la sécrétion de HDL par l'intestin, contrairement aux chylomicrons, se fait directement dans le compartiment plasmatique, sans emprunter la circulation lymphatique [366]. La biosynthèse des HDL débute par la production d'apoA1 et son enrichissement en phospholipides et en cholestérol par le transporteur ABCA1 [368]. A ce stade, les pre-HDL ne contiennent que très peu de cholestérol. Par la suite 3 protéines vont contribuer à l'enrichissement des HDL en cholestérol. Ainsi, la lécithine cholestérol acyltransférase (LCAT), l'ATP binding cassette G1 (ABCG1) et SRB1 vont participer à l'élévation des niveaux de cholestérol dans les HDL [369]. À l'inverse, la cholesteryl-ester transfert protein (CETP) appauvrit les HDL en cholestérol en substituant du cholestérol contre des TG aux LDL et aux VLDL. La CETP, longtemps envisagée comme une cible thérapeutique intéressante, a été la source de nombreux échecs. En effet, son absence naturelle chez la souris associée à des niveaux circulants de HDL importants en faisaient une cible thérapeutique de choix. Cependant, son absence, en raison de mutation, chez l'homme est athérogène [370] [371]. De plus, l'interruption de plusieurs essais cliniques a renforcé les craintes liées à l'inhibition de la CETP [372] [373] [374]. Cependant, le 27 juin 2017, Merck a présenté des résultats préliminaires positifs de l'anacetrapide, inhibiteur de la CETP, en terme de réduction des risques cardiovasculaires¹. Les résultats seront présentés le 29 août 2017 durant le congrès européen de la société de cardiologie (EAS).

5.10 L'Efflux Transintestinal de Cholestérol (TICE)

En plus d'être capable de sécréter du cholestérol, *via* les HDL, dans le compartiment sanguin, l'intestin excrète du cholestérol du compartiment sanguin vers la lumière intestinale. Dès 1927, Sperry et al puis Pertsemlidis en 1973 notent, chez le chien nourri avec un régime sans cholestérol, qu'une dérivation de la voie biliaire ne modifie pas la

1. <http://investors.merck.com/news/press-release-details/2017/Merck-Provides-Update-on-REVEAL-Outcomes-Study-of-Anacetrapib/default.aspx>

quantité de cholestérol excrétée dans les fèces [375] [376]. Par la suite, plusieurs modèles génétiques ont suggéré un découplage entre l'excrétion biliaire et l'excrétion fécale de cholestérol suggérant l'existence d'une voie alternative [270] [377]. Chez les souris déficientes en transporteur ABCG5/G8, caractérisées par une perte quasi totale de l'excrétion biliaire de cholestérol, l'excrétion fécale de cholestérol n'est pas abolie [270]. De la même façon, une délétion de la protéine ABCB4, ayant pour conséquence une diminution majeure de l'efflux biliaire de cholestérol, n'induit pas la disparition de l'excrétion fécale de cholestérol [377]. C'est en 2007 qu'une équipe hollandaise apporte la preuve directe que le cholestérol peut être excrété directement par l'intestin [378]. Ils montrent, ainsi, chez une souris dont l'efflux biliaire a été dérivé et l'intestin perfusé, que du cholestérol radiomarké injecté en intraveineuse est retrouvé très rapidement dans les perfusats intestinaux. Ils notent que l'activité du TICE est maximale dans le duodénum et décroît tout au long du tractus intestinal [378]. De plus, ils estiment que 33% du cholestérol retrouvés dans les fèces ont pour origine le TICE alors que seulement 17% proviennent de la voie hépato-biliaire [379]. Cependant, les mécanismes moléculaires responsables du transport du cholestérol directement du compartiment plasmatique à la lumière intestinale restent mal caractérisés.

Une des premières interrogations à été de déterminer l'origine du cholestérol délivré au pôle basolateral des entérocytes. *In vivo*, chez la souris et *ex vivo*, à partir d'explants intestinaux humains et murins, nous avons montré que des LDL et des HDL chargés avec du cholestérol radiomarké permettaient l'internalisation du traceur de cholestérol et son apparition dans la lumière intestinale ou dans le compartiment basolatéral [380]. Le rôle potentiel des HDL comme donneurs de cholestérol pour le TICE est sujet à controverse. En 2002, Plosch et al. notent que la stimulation du récepteur nucléaire LXR, régulateur du TICE, augmente l'excrétion fécale de cholestérol chez des souris présentant des niveaux bas de HDL [381]. De plus, Vrins CL et al. suggèrent, après une mesure directe du TICE, que les HDL ont un rôle négligeable dans ce transport [382]. Ces résultats sont nuancés par une autre étude de la même équipe publiée en 2017 [383]. Ils ont ainsi évalué la part du cholestérol éliminé via le TICE et provenant du retour inverse du cholestérol, porté majoritairement par les HDL. Une étude du groupe de Ryan Temel suggère que des lipoprotéines autre que les LDL seraient également des donneurs de cholestérol pour le TICE [384]. En effet, l'administration d'un oligonucléotide anti-sens dirigé contre la MTP

réduit les niveaux de VLDL et de HDL sans affecter ceux du LDL. Ils observent dans ces conditions une réduction significative du TICE [384].

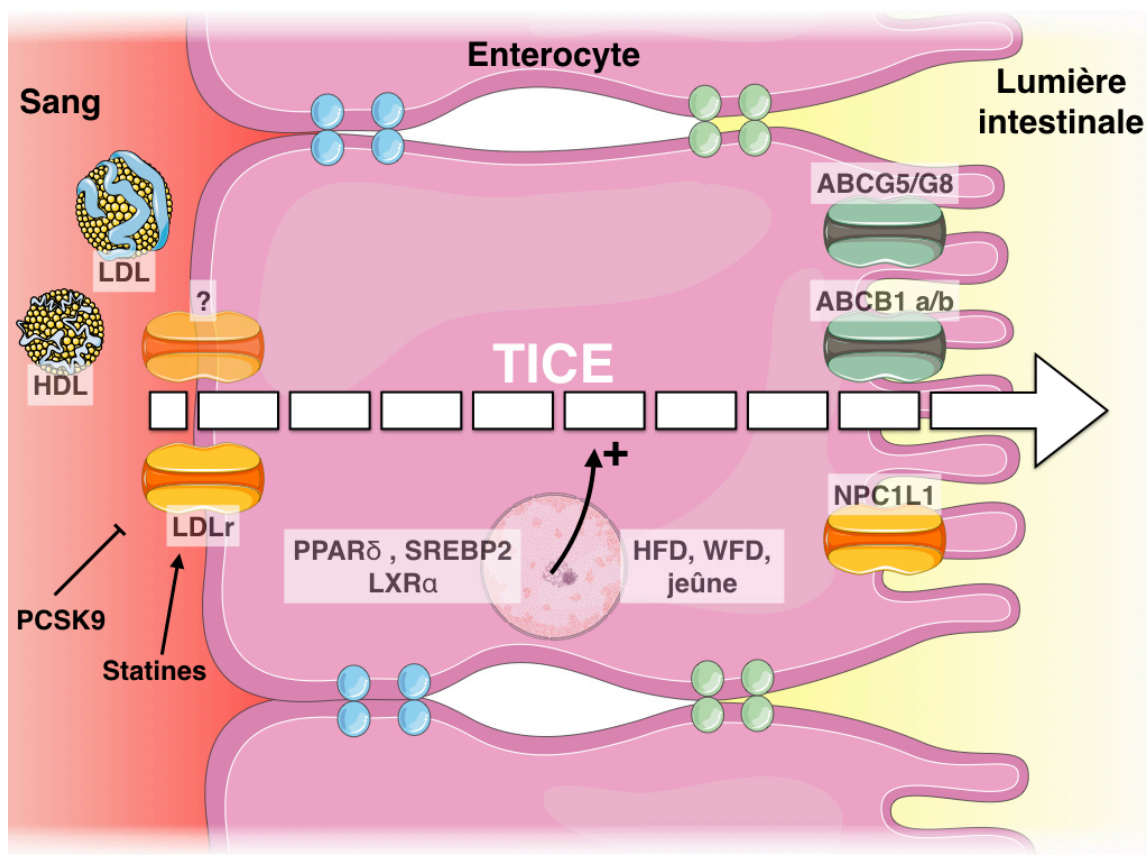


FIGURE 5.6 – Acteurs moléculaires impliqués dans le TICE. HFD (High Fat Diet) WFD (Western High Fat Diet)

Le TICE présente l'avantage d'être modulable (figure 5.6). En effet, l'état nutritionnel et certains agents pharmacologiques vont réguler le TICE. La présence d'accepteurs de cholestérol dans le compartiment luminal est nécessaire pour mesurer le TICE dans des conditions optimales. Ainsi, Van Der Velde et al. notent que le taurocholate (TC) et la phosphatidylcholine (PC) stimulent individuellement le TICE bien qu'un mélange des deux soit encore plus efficace [378] [385]. Le mélange TC/PC va former des micelles et capter le cholestérol présent dans la bordure en brosse des entérocytes. L'état nutritionnel et différents types de régime vont également moduler le TICE. Ainsi, un régime de type "western diet" (16% matières grasses, 0,25% cholestérol) et "hight fat diet" (24% matières grasses) stimulent le TICE respectivement de 50% et 100% [385] alors qu'un régime riche en cholestérol (5% matières grasses, 2% cholestérol) n'a pas d'effet sur le TICE [378]. Enfin, les phytostérols, connus pour leurs propriétés hypocholestérolémiantes, stimulent le TICE [386]. Selon sa durée, le jeûne module le TICE de façon opposée. Ainsi, un jeûne

court de 12h réduit le TICE de 28% alors qu'un jeûne long de 48h l'augmente de 50% [387]. Enfin, certains agents pharmacologiques vont influencer l'activité du TICE. L'activation du facteur de transcription LXR par des agonistes triple l'excrétion fécale de cholestérol associée à un doublement de l'efflux transintestinal de cholestérol [377] [379]. De la même façon, l'activation d'un autre facteur de transcription, PPAR δ , stimule le TICE [263]. Plus récemment, De Boer et al ont montré qu'un agoniste du récepteur nucléaire FXR augmentait massivement le TICE indépendamment de l'absorption. En effet, l'addition d'ezetimibe à l'agoniste FXR induit un effet synergique sur l'augmentation du TICE [383]. Enfin, l'ézetimibe, en inhibant NPC1L1, et les statines, en augmentant les niveaux de LDLR, stimulent le TICE [388] [380]. De nombreux travaux se sont également penchés sur les transporteurs impliqués dans le TICE. Les entérocytes expriment, au niveau du pôle basolatéral, deux transporteurs du cholestérol pouvant être impliqués dans le TICE : le LDLR et SRB1.

Le rôle de SRB1 dans le TICE est controversé. Van Der Velde et al. montrent qu'un régime hyperlipidique, connu pour augmenter l'expression de SRB1, augmente le TICE, suggérant ainsi son implication dans ce transport [385]. Cependant, la délétion de SRB1 chez la souris ne diminue pas le TICE [382], voire l'augmente [385]. De plus, la sur-expression intestinale de SRB1 chez des souris avec une excrétion biliaire de cholestérol altérée, n'a aucun impact sur le TICE [389]. La mesure du TICE dans un modèle de souris présentant une délétion intestinale de SRB1 permettrait de mieux identifier le rôle de SRB1 sur la voie trans-intestinale. Le rôle du LDLr dans le TICE est moins controversé. Ainsi, des souris déficientes en PCSK9, l'inhibiteur naturel du LDLr, montrent une augmentation des niveaux de LDLr et du TICE [380]. De plus, l'injection de PCSK9 recombinante réduit le TICE de 35% chez des souris sauvages, mais n'a pas d'effet sur des souris LDLr KO. Enfin, les statines, stimulant l'expression du LDLr, augmentent le TICE mais n'ont pas d'effet non plus chez des animaux KO pour le LDLr [380]. Ces résultats démontrent que le LDLr est le premier transporteur basolatéral impliqué dans le TICE. Il est surprenant de noter, cependant, que les souris KO pour le LDLr présentent une augmentation du TICE, suggérant le développement d'un mécanisme de compensation en réponse à l'absence native du récepteur [380]. À l'heure actuelle, aucune protéine intracellulaire n'a été identifiée comme participant au TICE. Cependant les protéines suivantes NPC1 et 2, MLN64 (metastatic lymph node 64 protein, anciennement STARD3), ORP1L

(oxysterol-binding protein 1L), LIMP2 (lysosomal integral membrane protein 2), ACAT2 (acetyl-CoA acetyltransferase 2), RAB7 et 9, connues pour leur rôle dans le transport du cholestérol intracellulaire, sont des candidates potentielles. De plus, l'activation de PPAR delta, stimulateur connu du TICE, induit l'expression de Rab 9 et LIMP2 dans l'intestin [263]. Au niveau du pôle apical des entérocytes, trois transporteurs semblent être impliqués dans le TICE : ABCG5/G8, ABCB1a/b et NPC1L1 (Figure 5.6). L'hétérodimère composé des protéines ABCG5 et ABCG8 est localisé dans la bordure en brosse des entérocytes et est responsable de l'efflux de cholestérol vers l'extérieur de la cellule [390]. La délétion de l'isoforme 5 provoque une réduction de 40% du TICE [379]. Le transporteur ABCB1, ou glycoprotéine P, est connu pour son rôle dans la résistance aux antibiotiques [391] mais a également été identifié comme un transporteur de lipides [392]. Les souris KO pour ABCB1 présentent un TICE réduit de 20% [380]. De plus, l'ajout d'un inhibiteur d'ABCB1 sur des explants intestinaux réduit le TICE, mais n'a pas d'effet sur des explants provenant de souris KO pour ABCB1. Enfin, le rôle de NPC1L1, transporteur responsable de l'absorption de cholestérol, est sujet à controverse. En effet, l'administration d'ezetimibe, un inhibiteur de NPC1L1, ne semble pas moduler le TICE [263]. Cependant, l'administration de cette même molécule provoque une augmentation importante du TICE dans une autre étude de la même équipe [388]. En effet, ils constatent, dans une nouvelle étude, une induction d'un facteur 4 du TICE après un traitement à l'ézetimibe [393]. Ainsi, NPC1L1 semble être impliqué dans le TICE et son inhibition permettrait d'éviter la réabsorption du cholestérol nouvellement excrété *via* le TICE.

Si la preuve de l'existence du TICE chez la souris a été rapportée dans de nombreuses publications [378] [379] [263] [380], son existence chez l'homme a été très récemment évoquée dans une étude hollandaise [393]. Le peu d'études du TICE chez l'homme s'explique par la difficulté de mesurer spécifiquement l'efflux de cholestérol provenant de l'intestin sans prendre en compte celui qui a pour origine la voie hépatobiliaire. Ainsi, des patients présentant une dérivation ou une obstruction totale des voies biliaires est une condition nécessaire à la mesure directe du TICE chez l'homme. Cependant, dès 1959, deux études sur des patients, présentant une obstruction biliaire, suggèrent l'existence d'une voie d'excrétion alternative au vu de l'abondance de cholestérol dans leurs fèces [394] [395]. En 1967, Simmonds et al. estiment que 44% du cholestérol présent dans les fèces proviennent de l'intestin [396]. Toutes ces études souffrent de la même limite qui est de ne pas pouvoir

différencier le cholestérol qui a pour origine le TICE de celui qui provient de la desquamation naturelle des entérocytes. En 2013, notre équipe a apporté la première preuve directe, *ex vivo*, de l'existence du TICE chez l'homme, à partir d'un explant intestinal humain. Ainsi, nous avons démontré *ex vivo*, que l'ajout, dans le compartiment basolateral, de LDL ou de HDL contenant du cholestérol radiomarqué induisait l'apparition du traceur de cholestérol dans le compartiment apical [380]. Plus récemment, Lily Jakulj et al. ont réalisé des mesures de TICE chez l'homme traité ou non avec de l'ézetimibe [393]. Ils confirment ainsi l'existence du TICE chez l'humain bien que la part de cholestérol excrété par le TICE soit plus faible que celle mesurée chez la souris. De plus, ils confirment le rôle d'ABCG5/G8 dans le TICE et montrent que ce dernier est également inductible par l'ézétimibe. Il ne s'agit cependant pas d'une mesure directe du TICE. En effet, leur étude se base sur une estimation de l'excrétion biliaire de cholestérol à partir de laquelle ils déduisent l'excrétion transintestinal de cholestérol. Il n'existe pas à ce jour de mesure directe du TICE chez l'homme. Une partie de ma thèse a donc consisté à apporter la preuve de concept *in vivo* de l'existence du TICE chez l'homme.

5.11 Dyslipidémies liées à une dérégulation intestinale.

L'intestin joue un rôle primordial dans la régulation du métabolisme lipidique par son implication dans l'absorption et la sécrétion des lipides. Des mutations touchant les gènes clefs des différentes étapes de l'absorption lipidique sont responsables de syndromes de malabsorption [397]. L'abêtalipoprotéinémie, causée par une mutation du gène codant pour la MTP, se caractérise par une malabsorption lipidique, un défaut de croissance et des diarrhées [398]. La MTP, dans l'intestin, favorise la lipodation de l'apoB48 [399] [400]. Une altération de la MTP conduit à la dégradation de l'apoB s'associant à une réduction de la sécrétion de chylomicron par l'intestin [401]. Une étude génétique a corrélé une baisse d'expression de la MTP et l'augmentation de l'espérance de vie [402]. Ils notent ainsi, la sous-représentation d'un polymorphisme du promoteur de la MTP, responsable d'une augmentation par 2 de son expression, dans un groupe de centenaires [403]. Ces études ont motivé le développement d'inhibiteurs de la MTP tels que le lomitrapide actuellement en phase 3 [404]. Cependant, compte tenu des risques de toxicité hépatique, sa distribution est

étroitement régulée [405]. Il existe également des inhibiteurs naturels de la MTP. Ainsi, l'ail, l'éthanol et les flavonoïdes réduisent son expression [406] [407] [408].

Les hypobetalipoprotéïnémies (HBL) sont dues à des mutations de l'apoB entraînant le plus souvent la production d'une forme tronquée de l'apoB. En conséquence, la sécrétion intestinale de chylomicrons est réduite [409]. Les formes hétérozygotes d'HBL peuvent être asymptomatiques, contrairement aux formes homozygotes associées entre autre à une quantité anormalement élevée de graisses dans les selles (steatorrhée), une malabsorption des vitamines liposolubles et une hypocholestérolémie. Le syndrome de rétention des chylomicrons, aussi connue sous le nom de maladie d'Anderson, est une maladie génétique peu représentée puisque seulement 50 cas sont répertoriés dans la littérature [397]. Cette pathologie est due à la mutation du gène SARA2 codant la protéine Sar1b, impliquée dans le recrutement des protéines SEC23 et 24, appartenant au complexe COPII. En conséquence, le passage des chylomicrons du RE au Golgi est altéré, provoquant ainsi une baisse de leur sécrétion par l'intestin. La sitostérolémie, ou phytostérolémie, se caractérise par une accumulation de phytosterols dans le plasma. Chez un patient sain, les phytosterols apportés par l'alimentation sont captés par le transporteur NPC1L1, dont l'affinité pour les phytosterols est moindre comparée à celle pour le cholestérol [410]. Au sein de l'entérocyte, une part mineure des phytostérols est incorporée aux chylomicrons alors qu'une part beaucoup plus importante est ré-excrétée vers la lumière intestinale *via* ABCG5/8. À la différence de NPC1L1, ABCG5/G8 présente une affinité plus importante pour les phytostérols que pour le cholestérol. Ainsi, des individus présentant une mutation affectant la fonctionnalité d'ABCG5 ou G8 excrètent moins efficacement les phytosterols et présentent des niveaux plasmatiques de phytosterols anormalement haute [411]. Chez ces patients, l'absorption des phytostérols est d'environ 25% alors qu'elle est inférieure à 5% chez des patients sains [411]. Les manifestations cliniques de cette pathologie vont de l'absence de symptôme à l'augmentation de la survenue d'accidents cardiovasculaires [412] [272]. L'absorption intestinale de cholestérol est principalement portée par NPC1L1. De nombreuses variations sur le gène codant NPC1L1 ont été mises en évidence [413]. Ces variations entraînent une modulation de l'absorption intestinale de cholestérol et des niveaux circulants de LDLc [413]. Plusieurs études ont ainsi caractérisé, *in vitro*, différents variants dont certains favorisent l'internalisation de cholestérol et d'autre la réduisent [414] [415]. Ces variations vont également impacter la capacité de l'ezetimibe, inhibiteur

de NPC1L1, à réduire l'absorption intestinale de cholestérol [416].

5.12 Cibler l'intestin pour lutter contre les dyslipidémies

5.12.1 Stratégies pharmacologiques

Les différentes étapes de prise en charge des lipides par l'intestin, de la digestion à la sécrétion des chylomicrons, sont la cible de stratégies thérapeutiques. La cholestyramine est un séquestrant des acides biliaires utilisé principalement dans le but de réduire la cholestérolémie. Son administration réduit le processus de micellisation et par voie de conséquence l'absorption intestinale de cholestérol. L'ézétimibe est également employée pour réduire l'absorption intestinale de cholestérol *via* son action inhibitrice sur le transporteur NPC1L1. Elle est souvent utilisée en association avec les statines puisque la baisse de l'absorption de cholestérol peut être compensée par un accroissement de la synthèse *de novo* de cholestérol par le foie. L'orlistat, en inhibant la lipase pancréatique, réduit l'absorption des TG [417]. Les TG non hydrolysés, peu absorbables, sont éliminés dans les fèces. En raison des lourds effets secondaires, seuls 10% des patients maintiennent le traitement au bout de 2 ans de suivi [418]. L'orlistat permet ainsi de contrer l'augmentation des TG plasmatiques observés en post-prandial [419]. En France, L'orlistat a été distribué dès 1999 sous forme de comprimés de 120mg. En 2009, un conditionnement de 60 mg, ne nécessitant pas d'ordonnance médicale, a reçu une autorisation de mise sur le marché. Cependant, en 2012, GSK arrête sa distribution en raison de son efficacité limitée. Les cellules entéroendocrines sécrètent deux hormones, le GLP1 et le GLP2, dont les effets sur le métabolisme lipidique sont contradictoires. GLP1 améliore le profil lipidique à l'état postprandial *via* une réduction de la sécrétion de chylomicrons par l'intestin [83]. A l'inverse, le GLP2 augmente d'une part l'absorption intestinale des lipides *via* CD36 et d'autre part, la quantité et la taille des chylomicrons à l'état postprandial [420]. Une des stratégies visant à favoriser l'action de GLP1 consiste à augmenter sa durée de vie, très courte, dans le plasma [421]. Une fois sécrété, GLP1 est dégradé rapidement par la dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4). L'inhibition de DPP-4 réduit la lipémie postprandiale chez l'homme [422]. Une seconde option repose sur l'administration d'analogues du GLP1,

présentant l'avantage d'augmenter considérablement les niveaux de GLP1 en comparaison de ceux obtenus après inhibition de DPP-4 [423]. Chez l'homme, les analogues du GLP1 réduisent les TG et le cholestérol plasmatiques. De plus, cette classe thérapeutique à prouver son intérêt dans la réduction des risques cardiovasculaires. Plusieurs études montrent les effets bénéfiques des agonistes GLP1 sur les risques cardiovasculaires [424]. Les phytostérols, dont la structure est proche de celle du cholestérol, sont connus pour leur capacité à réduire le LDLc [425]. Le campestérol et les sitostérols sont les deux principales formes de phytostérol retrouvées dans l'alimentation [426]. Employés dans un premier temps en clinique, leur utilisation s'est ensuite étendue à la population générale sous la forme d'alicament. Leur effet hypocholestérolémiant s'explique par une baisse de l'absorption intestinale de cholestérol et par l'augmentation de l'excrétion fécale de cholestérol. Ainsi, l'administration de phytostérols induit une baisse de l'absorption de cholestérol de 30 à 50% [427]. A titre de comparaison, l'ezetimibe réduit l'absorption du cholestérol de 90% [428]. Bien que les phytosterols soient responsables d'une augmentation de l'expression du transporteur ABCA1 au niveau basolateral des entérocytes, les niveaux plasmatiques de HDL restent inchangés [429] [430]. Chez la souris, l'enrichissement de l'alimentation en phytostérols stimule le TICE [386]. L'effet hypocholestérolémiant des phytostérols sous forme d'alicament est cependant limité. Pour favoriser leur solubilité dans les aliments, les phytostérols sont estérifiés réduisant par 10 leur efficacité[431]. De plus, la réduction de l'absorption intestinale de cholestérol est en partie compensée par la synthèse hépatique *de novo* du cholestérol [432]. Certaines craintes ont cependant été évoquées concernant la consommation accrue de phytostérols et la survenue de maladies cardiovasculaires [433]. Une méta-analyse n'a cependant relevé aucun lien entre la fluctuation des niveaux plasmatiques de phytostérols et la survenue d'accidents cardiovasculaires [426].

5.12.2 Stratégies chirurgicales

Les chirurgies bariatriques

Bien que l'obésité ne soit pas nécessairement associée à des dyslipidémies, les patients qui en sont atteints présentent une augmentation d'un facteur 2,7 de développer une dyslipidémie [434]. Depuis leur développement il y a plus d'un demi siècle, les chirurgies bariatriques ont démontré leur efficacité à améliorer le profil métabolique de patients dyslipidémiques [435]. Deux types de chirurgie sont principalement réalisés en France :

le by-pass roux en Y (RYGB pour Roux en Y Gastric Bypass) et la sleeve gastrectomie (Sleeve) (figure 5.7).

Le RYGB a été développé en 1993 et consiste à induire une malabsorption en déroutant le bol alimentaire du duodénum. Cette chirurgie consiste dans un premier temps à créer une poche stomacale correspondant à un volume de 30ml soit une réduction du volume de l'estomac de plus de 90%. l'intestin est ensuite sectionné au niveau de la jonction entre le duodénum et le jéjunum afin d'anastomoser la partie proximale du jéjunum à la poche précédemment décrite. La partie distale du duodénum est anastomosée au niveau de la jonction entre le jéjunum et l'iléon. Ainsi, L'intestin est réorganisé en trois anses. Une anse alimentaire correspondant à l'ancien jéjunum, une anse biliaire composée du duodénum et enfin une anse commune correspondant à l'ancien iléon. L'anse alimentaire réceptionne le bol alimentaire provenant de la poche gastrique qui subit une digestion sommaire. De plus, l'absence d'acide biliaire participant à la micellisation et la digestion des lipides alimentaires réduit l'absorption intestinale des lipides.

La sleeve consiste à réduire la taille de l'estomac à 150-200 ml soit environ à un tiers. Moins restrictive que le RYGB, la sleeve présente cependant certains avantages tels qu'une meilleure survie post-chirurgie et un temps opératoire plus court. Au sein de notre équipe nous avons adapté ces deux types de chirurgie chez la souris, techniques qui ont fait l'objet d'une publication dans le journal JOVE [436]. Les différences anatomiques entre la souris et l'homme nous ont conduits, cependant, à modifier certaines des procédures originales. Ainsi, dans le protocole du RYGB, l'intégrité de l'estomac n'est pas altérée et la partie proximale du jéjunum est anastomosée à la base de l'estomac. De plus, afin que le bol alimentaire n'atteigne pas l'anse biliaire, une ligature est réalisée à 1 cm en aval du pylore.

Conséquences métaboliques des chirurgies bariatriques

Plusieurs études s'alignent sur une amélioration des profils lipidiques après chirurgie pour plus de 60% des patients présentant une dyslipidémie [437] [438]. Elles notent ainsi, une réduction du LDLc et des TG s'accompagnant d'une augmentation des HDLc. En comparaison de la sleeve, le RYGB constitue la procédure chirurgicale dont les effets sur le HDLc sont les plus efficaces [439]. Le RYGB favorise également la réduction des LDL petites et denses (small dense LDL), qui sont oxydables et pénètrent facilement dans les parois des vaisseaux, leur conférant ainsi des propriétés hautement athérogènes [440].

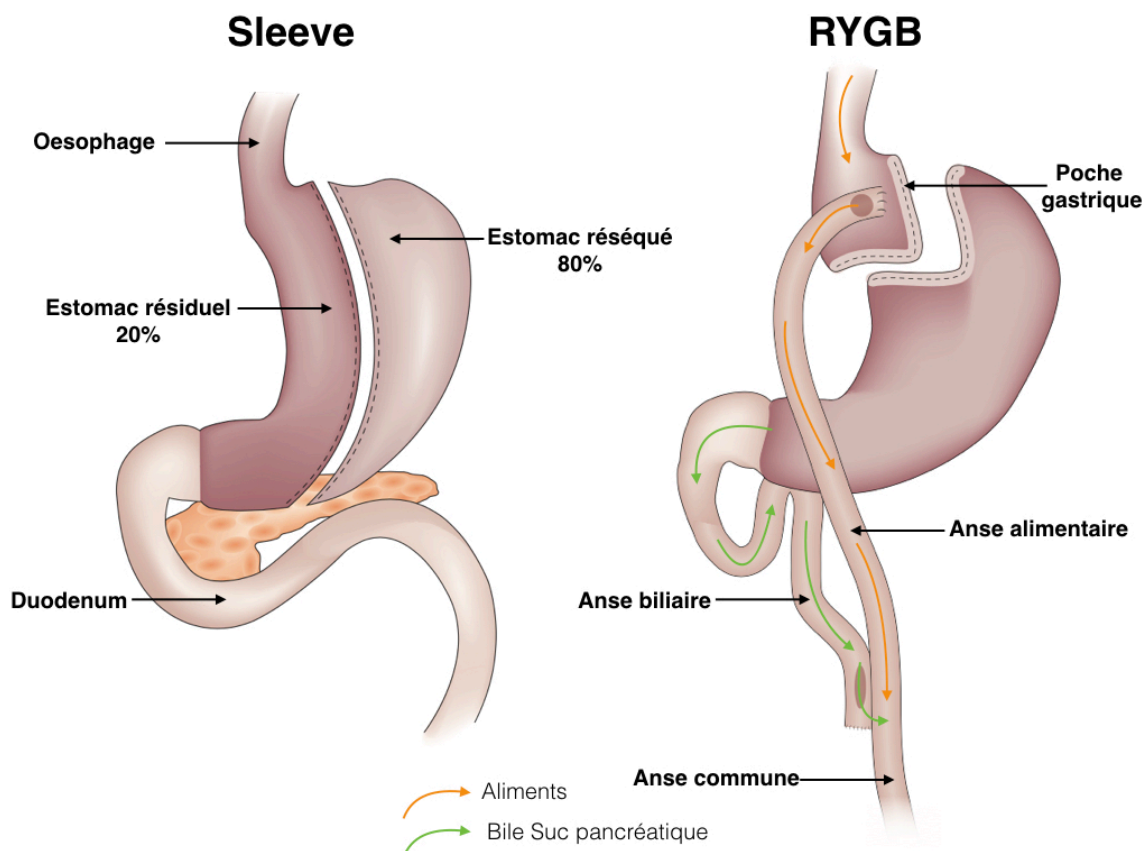


FIGURE 5.7 – Représentation du RYGB et de la Sleeve (adapté de Michel Gagner, 2015 et Rishi D. Naik, 2015)

Chez l'homme et la souris, la sleeve réduit les concentrations plasmatiques de TG en condition postprandiale [441] [442]. De nombreuses méta-analyses présentent également les effets du RYGB sur le DT2. Ainsi, cette procédure chirurgicale permet la rémission de 80% des patients diabétiques [443] [444]. L'amélioration des comorbidités associées à l'obésité a un effet bénéfique sur la mortalité. Ainsi, Sjostrom et al notent une réduction de la mortalité et des événements cardiovasculaires de 33% 16 ans après la chirurgie [445]. La participation du microbiote au métabolisme lipidique a été évoquée dans de nombreux travaux [446] [447]. Des modifications du microbiote ont été observées à l'issue du RYGB [448]. Ces changements pourraient expliquer, en partie, les effets bénéfiques de cette chirurgie. En effet, chez la souris, le transfert de la flore d'un animal opéré à celui d'un animal contrôle provoque une réduction du poids, significative 2 semaines après le transfert. L'augmentation des gammaproteobacteria chez la souris mais également chez l'homme et le rat à l'issue d'un RYGB suggère que cette souche pourrait être responsable de l'amélioration du profil métabolique après chirurgie [449] [450]. L'augmentation des niveaux plasmatiques en acides biliaires, fortement impliqués dans le métabolisme lipi-

dique, pourrait également expliquer les effets bénéfiques post-chirurgie [451] [452] [453]. Une étude récente suggère que cette augmentation de la quantité d'acides biliaires dans la circulation est due à un recapture hépatique moins efficace [454]. Ainsi, les acides biliaires abordés au niveau iléal sont acheminés *via* la veine porte jusqu'au foie où ils sont, pour une partie d'entre eux, réabsorbés. En plus de leur quantité augmentée, les proportions des différentes classes d'acides biliaires sont également modifiées après un RYGB. Ainsi, les formes tauro-conjuguées et particulièrement l'acide tauro- β -muricholique (T- β -MCA), chez la souris, sont augmentées après RYGB [455] [456]. Le rôle antagoniste du T- β -MCA pour FXR provoque une levée de l'inhibition de la synthèse des acides biliaires, pouvant participer à l'augmentation des niveaux circulants d'acides biliaires. De plus, l'implication de FXR dans les effets de ces deux types de chirurgie a été révélée dans plusieurs études [457]. Des modèles murins présentant une déficience en FXR ne maintiennent pas la réduction du poids observée après chirurgie [457]. FXR semble également impliqué dans la rémission du DT2 après chirurgie puisque son absence n'induit pas la baisse de la glycémie après chirurgie. L'intestin sécrète plusieurs hormones telles que GLP-1 et PYY régulant, entre autre, l'appétit et la sécrétion d'insuline. Le RYGB comme la sleeve augmentent la sécrétion de PYY et de GLP1 [458] [459] [453]. L'arrivée plus rapide du bol alimentaire, due à l'anastomose du jéjunum à l'estomac pour le RYGB ou à la réduction de l'estomac pour la sleeve, stimule la sécrétion du GLP-1 et du PYY par les cellules L de l'intestin [460] [461]. Dans la situation du RYGB, la sécrétion de PYY et de GLP-1 est également stimulée par la concentration importante d'acides biliaires libérés dans l'iléon, où la concentration du TGR5 est majeure, sans avoir été dilués dans le bol alimentaire [462]. La sécrétion accrue de PYY et de GLP-1 contribue à la réduction de la prise alimentaire, de la vidange gastrique et à l'augmentation de la sécrétion d'insuline [463]. Ces résultats sont cependant à nuancer car l'absence de GLP-1 n'empêche pas la perte de poids après une sleeve [464]. Les auteurs notent une amélioration globale du profil métabolique que ce soit après un RYGB, une sleeve, la pose d'un anneau gastrique ou une dérivation bilio-pancréatique. Ces résultats ont été confirmés par de nombreuses études [465] [466]. Cependant les mécanismes moléculaires responsables de l'amélioration métabolique sont très mal connus. Des études récentes montrent que les acides biliaires et FXR sont impliqués dans la perte de poids et les modifications du profil lipidique [467] [468]. Il est intéressant de noter que la réduction des TG et l'augmentation des HDL est du même ordre quelque soit la tech-

nique chirurgicale (figure 5.8). En revanche, la réduction du LDLc est variable selon la chirurgie. Nous avons souhaité caractériser les conséquences du RYGB sur le métabolisme du cholestérol et déterminer si une partie de la réduction de la cholestérolémie pouvait être due à une modulation du TICE.

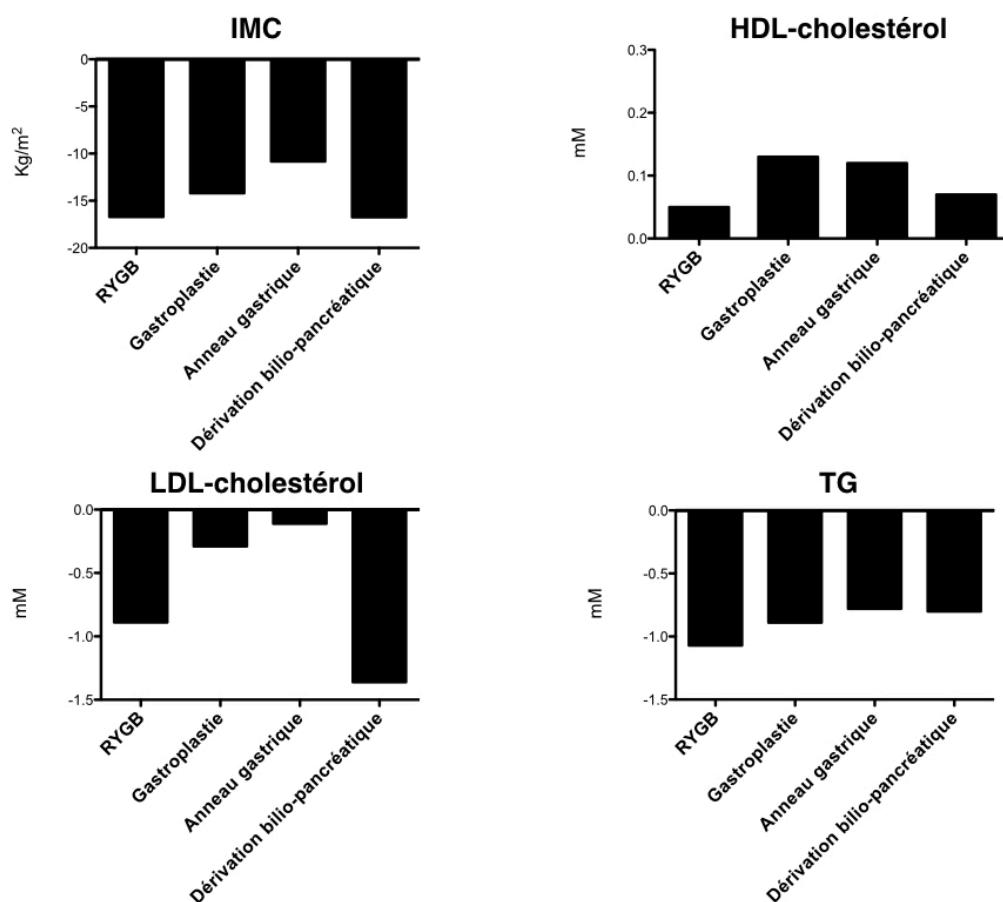


FIGURE 5.8 – Conséquences du RYGB et de la Sleeve sur le métabolisme lipidique. IMC, indice de masse corporel (adapté de Buchwald H, 2004)

5.13 Rôle intestinal de PCSK9

De nombreuses études se sont focalisées sur la forme hépatique de PCSK9 et peu sur les formes extra-hépatiques. Dans son étude de 2003, l'équipe de Nabil Seidah notait que l'intestin, en particulier le jéjunum et l'iléon, constituait le second organe majeur, après le foie, exprimant PCSK9 [89]. La génération de souris déficientes en forme hépatique de PCSK9 (foie-KO) suggère que les formes extra-hépatiques sont également impliquées dans le métabolisme du cholestérol. En effet, les souris présentant un KO total de PCSK9 montrent une baisse majeure de la cholestérolémie, significativement plus importante que

celle observée chez des souris dont le KO est restreint au foie [469]. Plusieurs groupes dont le notre se sont penchés sur le rôle de PCSK9 sur les grandes fonctions métaboliques de l'intestin. L'absence totale de PCSK9 n'altère pas les fonctions digestives intestinales telles que le transit et la vidange gastrique. En revanche, PCSK9 est impliquée dans la sécrétion de chylomicrons par l'intestin. En effet, son absence réduit significativement la lipémie postprandiale [470]. La réduction de la LPP s'associe à une augmentation de la taille des chylomicrons, favorisant ainsi leur internalisation par le foie puis leur élimination. L'absorption intestinale de cholestérol, majoritairement localisée dans le jéjunum, constitue une des fonctions majeures de l'intestin. Le rôle de PCSK9 sur ce dernier est sujet à controverse. Ainsi, Le May et al. montrent sur un modèle de souris déficiente en PCSK9, que ces animaux présentent une absorption intestinale de cholestérol similaire à celle des animaux sauvages [380]. À l'inverse, Levy et al montrent à partir d'un modèle d'entérocytes humains (CACO2), que PCSK9 favorise l'absorption intestinale de cholestérol en réponse à la réduction de l'internalisation de cholestérol par la face basolatérale [471]. Enfin, le TICE, du fait du rôle primordial du LDLr à son fonctionnement, est modulé par PCSK9 [380]. Ainsi, l'absence de PCSK9 stimule le TICE, alors que l'ajout de PCSK9 recombinant sur des explants intestinaux réduit son activité.

La génération de souris déficientes en forme hépatique de PCSK9 suggère que les formes extra hépatiques, dont la forme intestinale, ne sont pas sécrétées puisque les souris foie-KO, à l'instar des souris KO total, ne présentent aucune trace de PCSK9 dans la circulation plasmatique. Cependant, des travaux plus récents contredisent l'incapacité de l'intestin à sécréter PCSK9 [471]. En effet, les Caco-2 différenciées en entérocytes acquièrent la capacité de sécréter PCSK9. il apparaît donc difficile, à la vue de ces résultats contradictoires, de conclure à l'habilité ou non de l'intestin à sécréter PCSK9.

DEUXIÈME PARTIE

Publications

Roux-en-Y gastric by-pass reduces plasma cholesterol in diet-induced obese mice by affecting transintestinal cholesterol excretion and intestinal cholesterol absorption

L'objectif de ce travail a été de mieux caractériser les mécanismes impliqués dans les effets hypocholestérolémiants observés après chirurgie bariatrique. L'amélioration du profil métabolique après chirurgie a été décrit dans de nombreuses études. En revanche, l'impact de ce type de chirurgie sur le métabolisme du cholestérol ainsi que les mécanismes moléculaires mis en jeu sont peu présents dans la littérature. La baisse des niveaux de TG est comparable quelque soit la technique de chirurgie employée. En revanche, la diminution de la cholestérolémie passe du simple au triple après respectivement une sleeve ou un by pass. L'une de nos hypothèses consiste à accorder un rôle au TICE dans la baisse de la cholestérolémie après chirurgie.

Nos résultats confirment, dans un premier temps, l'impact des chirurgies bariatriques dans l'amélioration globale du profil métabolique. Les effets hypocholestérolémiants induits par la sleeve sont transitoires et liés, principalement à une variation de la prise alimentaire. En revanche, le Bypass réduit significativement et sur la durée les niveaux de cholestérol *via* une augmentation de l'excrétion fécale de cholestérol. Les mécanismes moléculaires impliqués sont 1) une réduction de l'absorption intestinale de cholestérol et 2) une augmentation significative du TICE.

Roux-en-Y gastric by-pass reduces plasma cholesterol in diet-induced obese mice by affecting transintestinal cholesterol excretion and intestinal cholesterol absorption

Running Title: Bariatric surgeries and cholesterol metabolism in mice

Claire Blanchard^{1, 2*}, François Moreau^{1*}, Audrey Ayer¹, Laurence Toque¹, Damien Garçon¹, Lucie Arnaud¹, Frederic Borel^{1, 2}, Audrey Aguesse^{3, 4}, Mikael Croyal^{3, 4}, Michel Krempf^{3, 4}, Xavier Prieur¹, Michel Neunlist^{6, 7}, Bertrand Cariou^{1, 5} and Cedric Le May^{1#}.

1. l'Institut du Thorax, INSERM, CNRS, UNIV Nantes, Nantes, France;

2. Service de Clinique de Chirurgie Digestive et Endocrinienne, CHU de Nantes, France

3. INRA, UMR 1280, Physiologie des Adaptations Nutritionnelles, CHU Hôtel-Dieu, F-44000 Nantes, France

4. CRNHO, West Human Nutrition Research Center, CHU, F-44093 Nantes, France.

5. l'Institut du Thorax, INSERM, CNRS, UNIV Nantes, CHU Nantes, Nantes, France

6. INSERM, U913, Nantes, F-44093, France

7. CHU Nantes, Institut des Maladies de l'Appareil Digestif, Nantes, France

*These authors contributed equally to this work

Correspondence to: Le May, Cédric, l'Institut du Thorax, INSERM UMR 1087-
CNRS UMR 6291, Nantes, France, cedric.lemay@univ-nantes.fr.

Abstract

Objective: Bariatric surgery appears as the most efficient therapeutic alternative in morbidly obese patients. In addition to its efficiency to decrease body weight, it also improves metabolic complications associated to morbid obesity, including dyslipidemia. Although the cholesterol-lowering effect varies with the bariatric procedures, the underlying molecular mechanisms remain poorly defined. This study aims to assess the consequence of both restrictive (sleeve gastrectomy) and malabsorptive (Roux-en-Y gastric bypass) procedures on cholesterol metabolism in mice.

Subjects: 10 weeks old C57BL6/J males were fed with a high fat diet for 8 to 14 weeks before sleeve or Roux-en-Y gastric bypass (RYGB) surgery.

Results: Sleeve gastrectomy has a modest and transient effect on plasma cholesterol levels, linked to a reduction in food intake. In contrast, modified Roux-en-Y gastric bypass led to a sustained $\approx 35\%$ reduction in plasma cholesterol concentrations with a drastic increase in fecal cholesterol output. Mechanistically, Roux-en-Y gastric bypass exerts a synergistic effect on cholesterol metabolism by inducing the trans-intestinal cholesterol efflux and reducing the intestinal cholesterol absorption.

Conclusion: In mice, RYGB, but not sleeve, strongly favors plasma cholesterol elimination by concomitantly increasing TICE and by decreasing intestinal cholesterol absorption. Our models open new perspective for deciphering the hypocholesterolemic effects of bariatric procedures.

Keywords: Roux-en-Y gastric by-pass, Sleeve Gastrectomy, Dyslipidemia, Hypercholesterolemia, TICE, bile acid

Introduction

Obesity is a major public health issue, with increased prevalence from 4 to 28 % for men and from 6 to 36 % for women in Europe (from 2003 till 2008)¹. Morbid obesity is frequently associated with metabolic complications such as type 2 diabetes, hypertension, and dyslipidemia, pulling a reduction of both quality of life and life expectancy². Currently, bariatric surgery emerges as the therapeutic alternative of choice for morbidly obese patients and is in full progress worldwide³.

A number of different surgical methods have been developed but sleeve gastrectomy (SG) and Roux-en-Y gastric bypass (RYGB) are the two most commonly used procedures in clinical practice³. During the SG procedure, ≈80% of the initial volume of the stomach is removed. SG belongs to the restrictive bariatric techniques that act by increasing satiety. The RYGB is one of the “malabsorptive” techniques. During RYGB, a small gastric pouch (1-2% of total gastric volume) is created and the intestine is rearranged in a Y-shaped anatomy that promotes a delay of digestion and absorption of nutrients. These two techniques lead to significant body weight reduction and improvement of frequently associated comorbidities (high blood pressure, diabetes, dyslipidemia) with a global higher efficiency for RYGB compared to SG⁴.

Dyslipidemia is clearly improved after bariatric surgery, but in a different manner according to the surgical techniques⁴. In a large meta-analysis, both SG and RYGB decrease plasma triglyceride (TG) and increase high-density lipoprotein cholesterol levels in a similar extent. In contrast, the decrease of plasma low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) is more pronounced after a malabsorptive procedure (RYGB, biliopancreatic diversion) than a restrictive surgery (SG, gastric banding)⁴. These clinical observations suggest that the underlying cellular and molecular mechanisms differ between the bariatric procedures to modulate LDL-C metabolism.

The liver is the master regulator of cholesterol metabolism and mainly acts by regulating the endogenous cholesterol synthesis and the uptake of cholesterol containing

chylomicron remnants and LDL particles. Beyond the liver, the small intestine is the second major organ involved in cholesterol homeostasis⁵. First, its anatomical multi-folded structure and the presence of specialized cholesterol transporters allow the efficient absorption of dietary cholesterol. More importantly, it also ensures the re-uptake of newly secreted cholesterol from biliary and non-biliary origins^{5,6}. Indeed, the existence of a non-biliary route contributing to fecal sterol loss was suspected decades ago in dogs, rats, and later in humans with impaired biliary secretion, but definitively demonstrated in mice in 2007⁷. This pathway named TransIntestinal Cholesterol Excretion or TICE exports plasma cholesterol directly via the intestinal barrier to the intestinal lumen⁷. In C57BL6 mice under standard chow diet, TICE is responsible for 33% of the fecal cholesterol loss, that is twice the amount excreted by the biliary pathway⁸. Very recently, *in vivo* kinetic studies performed in humans have shown that TICE may contribute to 35% of the fecal cholesterol loss [9]. More importantly, the pharmacological induction of TICE by ezetimibe can considerably increase the fecal neutral sterol excretion^{8,9}.

The objective of our study is to better understand the effect of bariatric surgeries on cholesterol homeostasis by assessing the consequence of two mouse models of bariatric surgery, *i.e.* the SG and the RYGB on the intestinal cholesterol absorption, biliary excretion and TICE.

Materials and methods

Animals and Diets:

Ten weeks old C57Bl/6 mice (purchased from Charles River ; L'Arbesle, France) had free access to water and high-fat diet (*DIO diet 35%kcal from fat, Laboratoire Safe, France; caseine 25.8%, mineral AIN 1.30%, vitamins 1.30%, phosphate bicalcique 1.70%, calcium carbonate 0.7%, citrate potassium 2.10%, choline bitartrate 0.026%, sucrose 8.9%, cystine 0.384%, cellulose 6.5%, lard 31.7%, soybean oil 3.3%, maltodextrine 16.29%*) for 8 (SG) or 10-14 weeks (RYGB) prior bariatric surgeries. The initial number of mice used in each experimental group was estimated according to previous studies implying bariatric surgery in rodents¹⁰⁻¹⁶. Before surgery, mice were randomized on body weight and plasma cholesterol and three groups were performed: Sham, Pair-fed (which received the same quantity of food than SG or RYGB groups) and SG/RYGB. To promote weight gain, mice dedicated to the RYGB surgery (Sham, Pair-fed & Bypass) received in addition to the high-fat diet, water containing 20% fructose (w/v). No blinding was performed. All experiments were approved by the Ethic Committee for Animal Experimentation of Pays de la Loire (study n° 01953.01).

Bariatric surgery

Surgical procedures that are resumed in supplemental files have been fully described in a manuscript and videos accepted in the Journal of Visualized Experiment¹⁷. Briefly, the SG procedure consists to remove 80% of the stomach by discarding the greater curvature and the entire fundus of the stomach. During RYGB, a gastrojejunostomy without stomach excision is created and the intestine is rearranged in a Y-shaped anatomy.

Food intake measurement

Mice were allowed to recover one week after surgery and were housed in individual cage. Each day, the amount of solid diet placed in the cage was weighted and the residual food

was measured 24 hours later. The average daily food intake was measured from day 7 after surgery to day 28 in the SG group, and from day 7 after surgery to day 35 in the RYGB group.

Glucose homeostasis assessment

For longitudinal studies, blood glucose levels were measured every Monday in fed condition (To allow a homogenous gastric emptying, food was removed at 8:00 AM and measurement performed at 11:00 AM). Oral glucose tolerance tests (OGTTs) were performed three weeks after surgeries in 6h fasted mice. Blood glucose values were measured using a glucometer (One Touch®, Lifescan) at 0, 15, 30, 60 and 120 minutes after an oral gavage of 20% D-glucose solution (2g/Kg).

Biochemistry

Plasma samples were harvested after 3h fasting to allow gastric emptying. Plasma total cholesterol and TG concentrations were determined using a commercially available kit (SOBIODA, France). Plasma PCSK9 levels were assayed in duplicates using an ELISA assay following the manufacturer's instructions (Circulex CY-8079, CycLex Co.).

Fecal, biliary and transintestinal cholesterol excretion.

Three days before measurement, mice were anesthetized with isoflurane and received 0,3 mg of cholesterol-D7 in 100 μ L intralipid by intra penile injection and oral gavage of 0.6 mg cholesterol-D5 in 200 μ L olive oil and were placed in individual cage for 3 days. Daily feces production was harvested every 24h for 3 days. The third day mice were fasted for 3 hours, then anesthetized with a xylazine/ketamine solution (10/80 mg/kg, i.p. injection) and placed onto a heat pad. Perfusion solution composition as well as surgical procedures to realize bile duct diversion and proximal intestinal cannulation was performed as previously described^{7, 18}. Biliary and alimentary intestinal limbs were simultaneously perfused using a stable output

flux of 5 ml/h for 2 hours. Blood, bile and intestinal perfusate samples were harvested after the procedure and D7/D5 cholesterol content was further analyzed by GC-MS.

RNA analysis

The intestinal mucosa was harvested as previously described¹⁹ and total RNA from tissues was purified using Trizol (Life technology, les Ulis, France) according to the manufacturer's instructions. Total RNA from cell samples was purified with the NucleoSpin RNA II (Macherey Nagel, Hoerd, France). Total RNA (500 ng) was reverse-transcribed and real-time quantitative PCR was performed using the TaqMan 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Warrington, UK). Primers were designed using the Primer Express 3.1 software and described below. Results are represented as arbitrary units indicating relative expressions by calculation based on the comparative Ct (also called Δ Ct) methods after normalisation to cyclophilin or 36B4 as the reference genes (indicated in the figure legend where applicable).

Western Blot

The intestinal mucosa was harvested as previously described¹⁹ and was homogenized in a RIPA buffer containing protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostic). Total lysate proteins were resolved on NuPAGE 4–12% BisTris gels in MES SDS buffer (Invitrogen) under reducing conditions and transferred using Iblot system onto a nitrocellulose membrane (Invitrogen). Membranes were probed with antibodies raised against the mouse LDLR antibody (R&D Systems Europe, Lille, France) and β actin (Millipore, France). Immunoreactive bands were revealed using the ECL plus kit (Amersham Biosciences).

Statistics

All results are reported as means \pm SEM. Statistical significance was analyzed using ANOVA

test and non-parametric Mann-Whitney test, with Graphprism® (Graphpad Software). The values of $p < 0.05$ were considered as significant.

Results

Sleeve gastrectomy and Roux-en-Y gastric bypass reduce body weight and improve glucose homeostasis

To assess the effects of bariatric surgeries on cholesterol metabolism, we adapted two models of bariatric surgeries routinely performed in clinical practice, in mice: SG (Figure S1A) and a modified version of the RYGB (RYGB; Figure S1B). Mice had similar body weight prior surgery. SG operated mice displayed a significant weight loss 14 days after surgery compared to sham control mice (28.7g vs 31.8g; $p=0.008$) (**Figure 1A**), and a trend for epididymal fat pad weight reduction (-27%, $p=0.10$). Both Pair fed and SG mice show a 15% reduction of food intake compared to sham control mice (**Figure 1C**). The extent of body weight change was more important following RYGB surgery compared to SG. Two weeks after surgery, RYGB operated mice lost 20% of their pre-operative body weight ($p<0.001$) (**Figure 1B**). While we observed a significant reduction of food consumption in the RYGB mice in the first ten days following the surgery, there was no further significant change in food intake after surgery recovery from Day 10 to Day 35 (**Figure 1D** and Figure S3). Consistently, the epididymal fat pad weight was reduced by more than 80% in the RYGB group compared to the sham group (respectively: 1947 ± 123 mg and 352 ± 132 mg, $p<0.0001$). Five weeks post surgery, the body weight loss reached 28% of the preoperative weight in the RYGB group compared to only 4% and 9% in the sham and pair-fed groups (**Figure 1B**). Longitudinal random-fed blood glucose follow-up as well as OGTT showed a significant improvement in glucose homeostasis after SG and RYGB surgeries (**Figure 1E-H**).

Figure 1

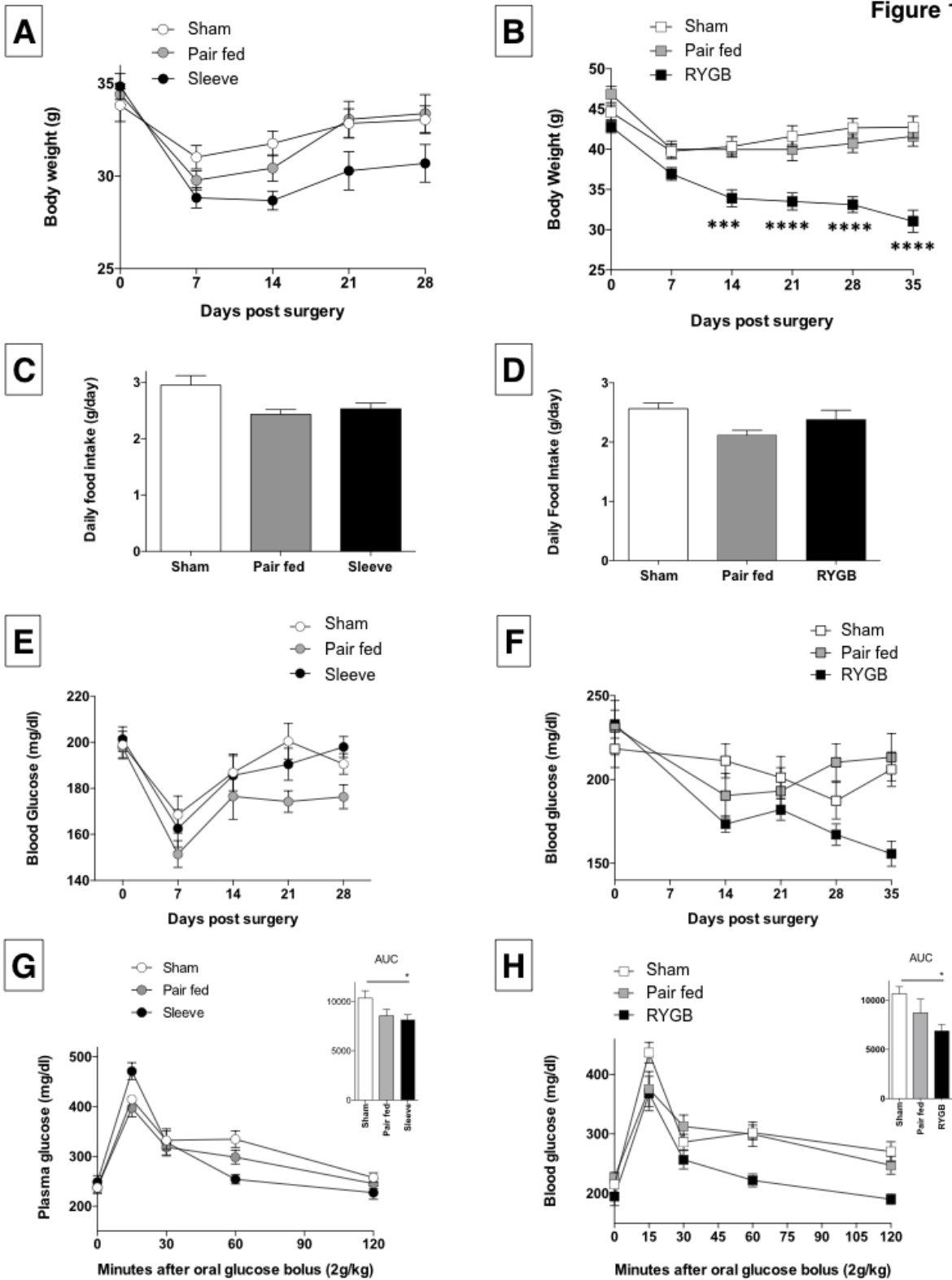


Figure 1: Effect of SG and RYGB on body weight (A, B); on daily food intake (C, D); on plasma glucose (E, F); and on oral glucose test tolerance (G, H). Inserts represent area under the curve. Data are shown as mean value \pm SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, Mann-Whitney test between sham and SG and RYGB groups. Panels A, C, E & G: Sham $n = 22$; Pair fed $n = 24$; Sleeve $n = 24$. Panels B, D, F, H: Sham $n = 14$; Pair fed $n = 8$; RYGB $n = 19$.

RYGB reduces plasma cholesterol concentrations by stimulating fecal cholesterol excretion.

Following several weeks of high-fat diet, all mice were equally hypercholesterolemic with plasma cholesterol levels prior surgery over 1.5 g/L (**Figure 2A-B**). Two weeks after SG, a significant reduction of plasma total cholesterol was observed in both SG (-36.3%; $p < 0.0001$) and Pair-fed groups (-34.9%; $p < 0.0001$), with also a trend for decrease in sham group (-16.1%, $p = 0.06$) (**Figure 2A**).

This mild hypocholesterolemic effect was transient and lost three weeks after SG. The fecal cholesterol output measured two weeks after the SG was not significantly altered (**Figure 2D**). In contrast, RYGB surgery induced a strong and persistent cholesterol-lowering effect with a significant reduction of 42%, 32.4%, 37.5% and 33.7% of plasma total cholesterol concentrations 2, 3, 4 and 5 weeks after surgery, respectively ($p < 0.0001$). , Importantly, no hypocholesterolemic effect was observed in the Pair-fed group compared to sham control mice, suggesting that RYGB reduced plasma cholesterol levels independently of change in food intake. FPLC analysis showed a disappearance of the large HDL peak after RYGB compared to the sham control mice (Figure S2). Interestingly, the fecal cholesterol excretion was highly induced (+356%, $p = 0.0002$), five weeks after RYGB (**Figure 2F**). Moreover, we confirmed that plasma D7 cholesterol is excreted almost 4 times more in the RYGB compared to Sham groups ($p = 0.006$) (**Figure 2G**), suggesting that pathways involved in plasma cholesterol elimination are significantly increased following RYGB.

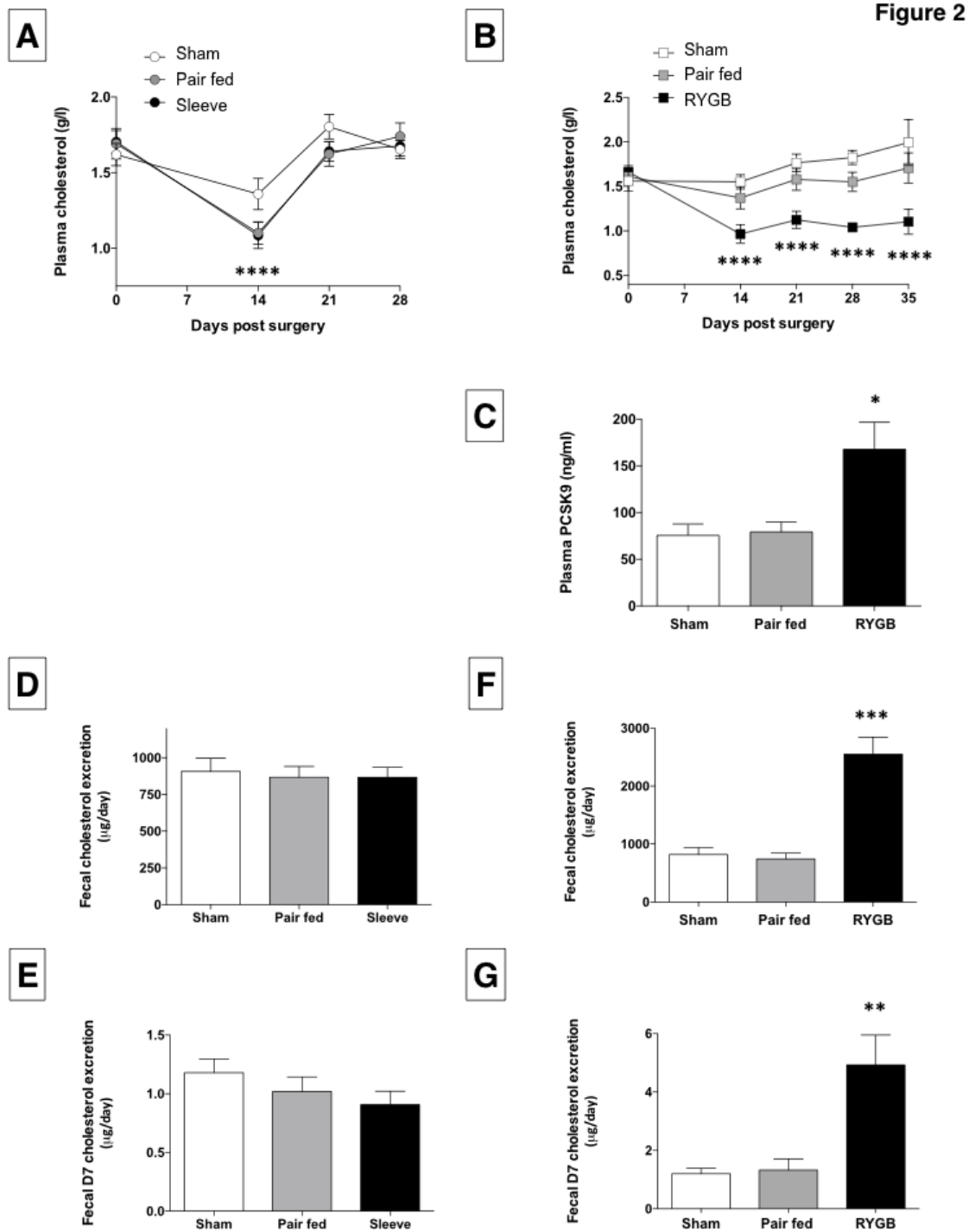


Figure 2: Effect of SG and RYGB on plasma cholesterol (A, B); Effect of RYGB surgery on circulating PCSK9 levels (C); Effect of SG and RYGB on fecal cholesterol excretion (D, F); Effect of SG and RYGB on fecal D7 cholesterol excretion (E, G). Data are shown as mean value \pm SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. Mann-Whitney test between sham and SG and RYGB groups. Panels A, D, E: Sham $n = 22$; Pair fed $n = 24$; Sleeve $n = 24$. Panels B, C, F, G: Sham $n = 14$; Pair fed $n = 8$; RYGB $n = 19$.

RYGB-induced hypocholesterolemia is not due to reduced plasma PCSK9 concentrations

The proprotein convertase subtilisin kexin type 9 (PCSK9) is an endogenous inhibitor of the LDL receptor (LDLR) and a master regulator of plasma cholesterol homeostasis²⁰. Thus, we determined whether the sustained hypocholesterolemic effect observed after RYGB could be linked to a reduction of PCSK9 expression. However, hepatic PCSK9 mRNA levels were significantly increased in the RYGB compared to sham group (**Table 1**). Consistently, plasma PCSK9 levels were significantly higher in the RYGB group compared to controls (**Figure 2C**). Altogether, these data indicate that PCSK9 is not involved in the hypocholesterolemic effect of RYGB.

RYGB does not affect biliary cholesterol efflux but induces TICE

Two pathways have been involved in the plasma cholesterol elimination, the classical hepato-biliary route and the newly described TICE pathway. In order to better understand their respective roles in the increased cholesterol fecal loss, we concomitantly measured the effect of RYGB on these two pathways. As shown in Figures 3A & B, RYGB did not affect the biliary efflux of cholesterol (**Figure 3A**) or plasma injected D7 cholesterol (**Figure 3B**). Consistently, hepatic gene expression of the human sterol transporters ABCG5 & ABCG8 is reduced by 63% ($p < 0.05$) and 19% (ns) in RYGB compared to sham groups (**Table 1**). In contrast, the TICE was increased by 66% compared to sham procedure 5 weeks after RYGB (**Figure 3C**). The trans-intestinal efflux of D7 cholesterol also tended to be increased (+48.5%, $P = 0.20$), but it failed to reach significance due to higher heterogeneity of the results (**Figure 3D**).

Figure 3

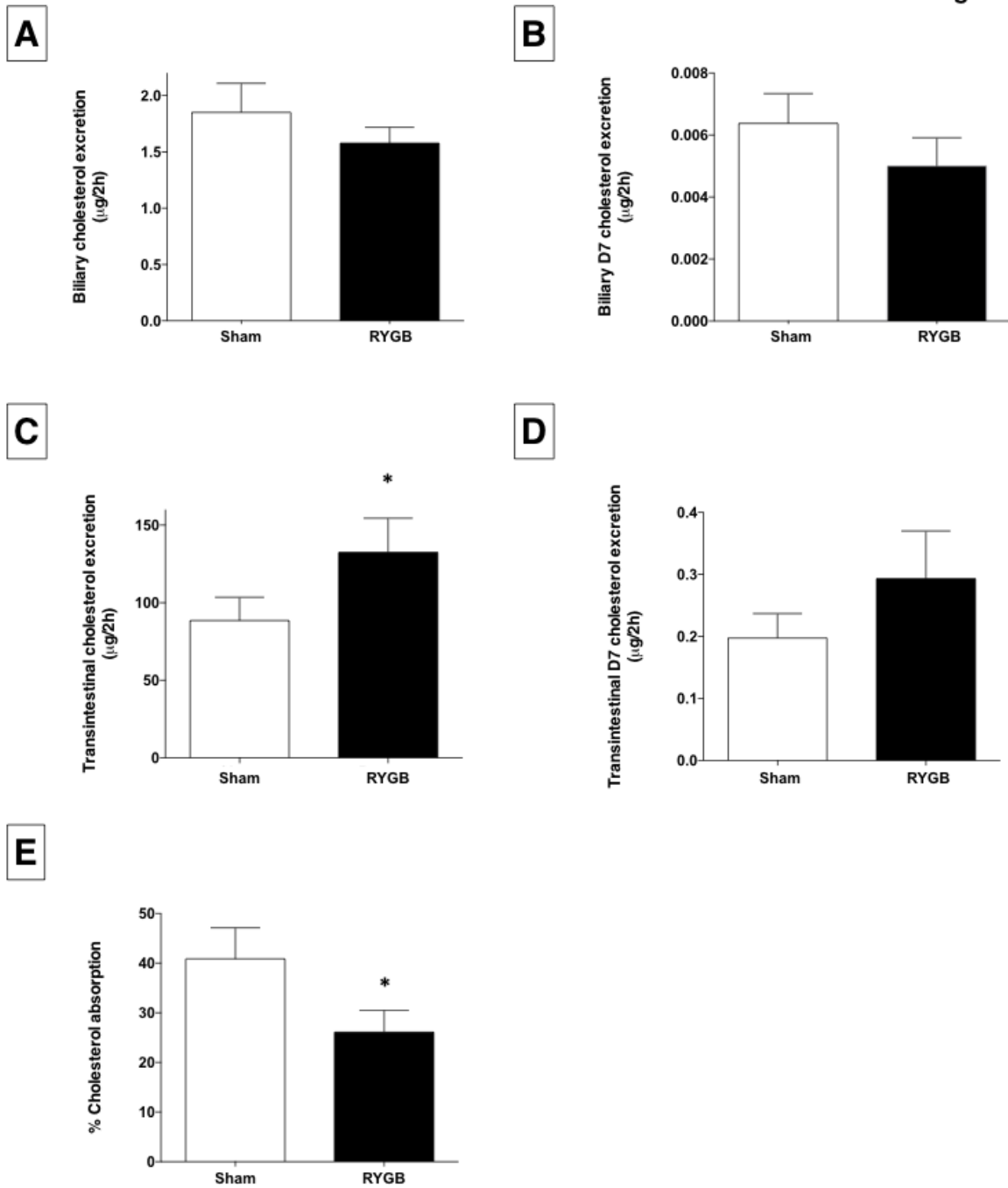


Figure 3: Effect of RYGB on biliary cholesterol excretion, sham n=8 RYGB n=5 (A); on D7 biliary cholesterol excretion, sham n=8 RYGB n=5 (B); on Transintestinal cholesterol excretion, sham n=12 RYGB n=8 (TICE) (C); on Transintestinal D7 cholesterol excretion, sham n=12 RYGB n=8 (D); on intestinal cholesterol absorption, sham n=8 RYGB n=9 (E). Histograms represents means \pm SEM. * p<0.05; Mann-Whitney test between sham and RYGB groups.

RYGB surgery reduces intestinal cholesterol absorption

Finally, using the dual isotope ratio method, we measured the intestinal ability of sham control and RYGB operated mice to absorb orally administered cholesterol. Five weeks after surgery, fractional cholesterol absorption was about $40.8\% \pm 6.3$ in the sham group (**Figure 3E**), while intestinal cholesterol absorption was reduced by 36% in the RYGB group ($26.1\% \pm 4.4$). Intestinal mucosa mRNA expression analysis in the 3 intestinal limbs (Biliary, Alimentary and Common) did not reveal any change in Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1) transporter but found a significant decrease in CD36 and SRBI in the alimentary limb (**Table 2**).

RYGB alters fecal and plasma bile acids levels

To determine whether RYGB alters bile acids homeostasis in our model, we analyzed the plasma and fecal bile acids contents by mass spectrometry. We found a significant increase in total plasma bile acids levels (**Figure 4A**) as well as some relative changes in plasma bile acids composition after RYGB (**Figure 4B**). Almost all classes of bile acids were induced following RYGB but the highest changes involved cholic acid, beta and omega muricholic acid, lithocholic acid and ursodeoxycholic acid (**Figure 4C**). Our data also revealed an increased fecal elimination of alpha and beta muricholic acid in the RYGB compared to sham group (**Figure 4D**). At the hepatic level, the mRNA expression of bile acid target genes such as CYP7A1, FXR and SHP were unaltered (**Table 1**).

Figure 4

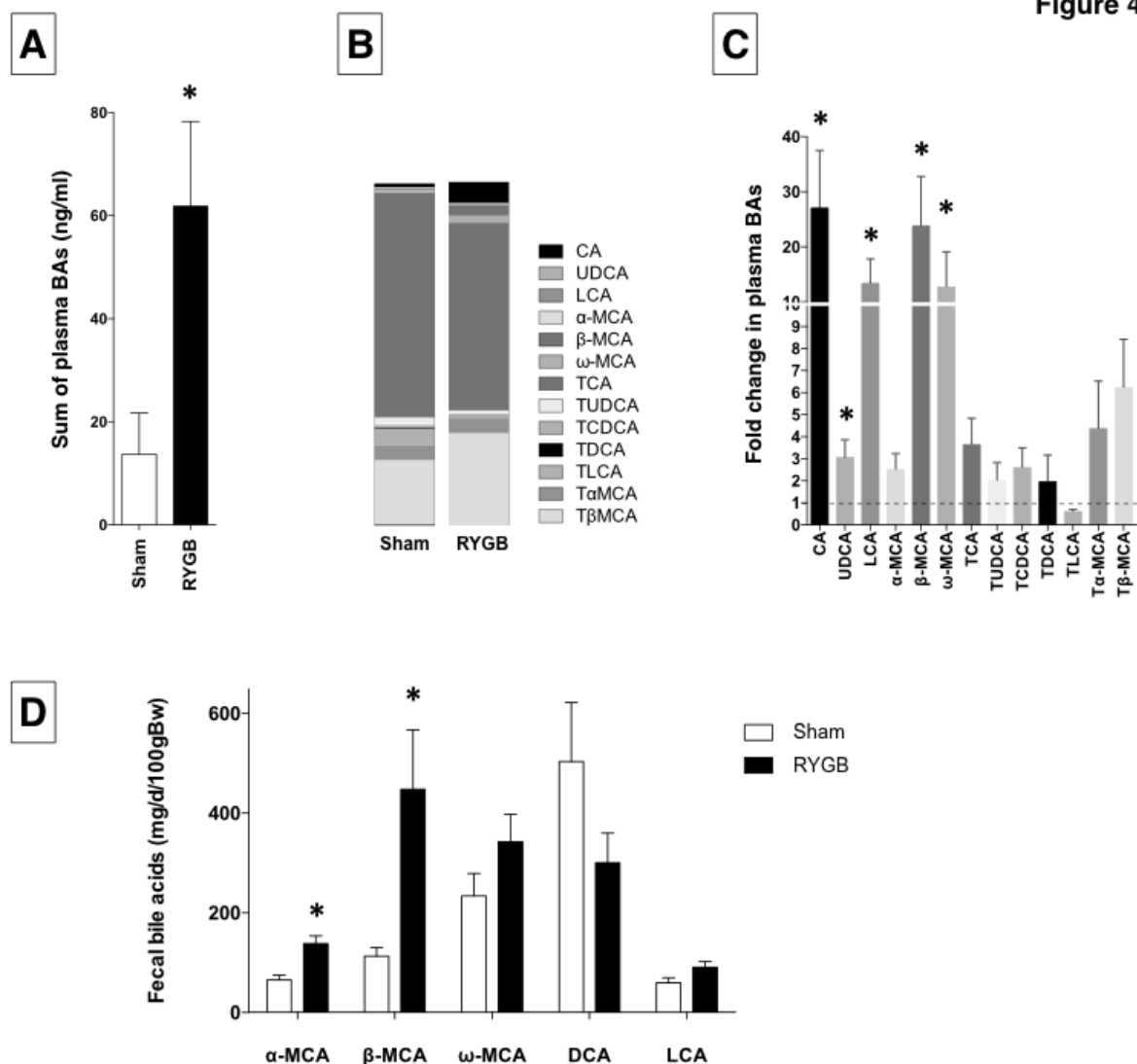


Figure 4: Effect of RYGB on plasma bile acids concentration (A); on relative plasma composition (B); on induction of plasma bile acids (C). Effect of RYGB on fecal bile acids excretion (D). Histograms represent mean values \pm SEM. * $p < 0.05$; Mann-Whitney test between Sham and RYGB groups. Panels A, B, C sham $n = 11$ RYGB $n = 10$; Panel D sham $n = 7$ RYGB $n = 9$.

Discussion

Bariatric surgery is the most efficient approach to reduce body weight and metabolic complications related to morbid obesity. In humans, plasma LDL-C levels are clearly reduced after bariatric surgery, but the magnitude of the LDL-C lowering seems to be dependent on the surgical procedures⁴. In this study, we aim to unravel the underlying mechanisms sustaining the improvement of the hypercholesterolemia with the 2 most frequent bariatric procedures: SG and RYGB.

To address this question, we developed two mice models of SG and a modified RYGB, as described before¹⁰. As expected¹¹⁻¹³, we observed that RYGB, and in a lesser extent SG, induce a significant reduction of body weight and adiposity as well as a significant improvement of glucose homeostasis, thereby validating our surgical models.

Importantly, we demonstrated for the first time a differential effect between SG and RYGB on cholesterol metabolism in mice. On the one hand, SG induces a modest and transient hypocholesterolemic effect, and importantly this change occurs without affecting the hepatobiliary, the transintestinal and the global fecal output of plasma cholesterol. This slight effect is likely due to a reduction in food intake since it was similarly observed in Pair-fed mice. However, it is important to notice that previous studies reported more persistent hypocholesterolemic effect of SG in mice and rats¹⁴⁻¹⁶. On the other hand, RYGB induces a strong and sustained cholesterol-lowering effect with an improved pattern of circulating lipoproteins. In contrast to what observed in SG, such beneficial effect does not appear to be linked to a modification in food intake since: i) our RYGB model does not affect the stomach size and the daily food intake compared to sham mice; ii) we observed a significant reduction of total cholesterol in the RYGB group compared to the pair-fed group. Thus, our mice models mimic the differential effects of SG and RYGB on plasma cholesterol levels in humans⁴, which was a prerequisite to further decipher the underlying molecular mechanisms.

The reduction of plasma cholesterol induced by the RYGB seems to be mainly driven by an

increase of fecal cholesterol output. To date, two routes have been described to be quantitatively involved in this process, the hepatobiliary and the TICE pathways (reviewed in⁶). In mice, the TICE has been demonstrated to be the main route for plasma cholesterol efflux and appears twice as much efficient than the biliary pathway under basal condition⁸. More recently, both *ex vivo* studies on human intestinal biopsies¹⁸, and *in vivo* kinetic measurement demonstrated that TICE is also active in humans⁹. Whereas the biliary pathway appears to be the main route of cholesterol elimination under unstimulated condition⁹, the TICE could be strongly induced pharmacologically to increase the fecal sterol loss⁹. Finally, a fraction of the cholesterol excreted by these two routes can be reabsorbed by the small intestine. Therefore, the fractional cholesterol absorption efficiency can also largely modulate the fecal excretion of plasma cholesterol.

Five weeks after surgery, RYGB does not significantly alter the biliary efflux of both total unlabelled or D7 cholesterol. Consistently, the hepatic mRNA levels of the main biliary cholesterol transporters ABCG5 and ABCG8²¹ were not increased, but rather reduced after RYGB. In addition, both HMG CoA reductase and SREBP2 mRNA levels are unaffected following RYGB (**Table 1**), suggesting that the endogenous synthesis of cholesterol was not altered. Surprisingly, we found a significant reduction of hepatic LDLR gene expression and an increase of hepatic PCSK9 mRNA levels. In accordance with our results, another study recently reported that RYGB and biliary diversion strongly induce PCSK9 hepatic expression in mice²². At the protein level, we confirmed that circulating plasma PCSK9 levels were significantly increased after RYGB and that hepatic LDLR protein content was reduced (*data not shown*). Finally, hepatic LRP1 mRNA levels remain unaltered after surgery. Together, these data suggest that RYGB does not reduce plasma cholesterol by increasing hepatic plasma cholesterol clearance or hepatobiliary cholesterol efflux.

One of our key finding is that the TICE is significantly increased 5 weeks after RYGB. This pathway is to date poorly characterized and only few molecular determinants of the TICE have been identified. Nevertheless, it has been previously demonstrated that the TICE

appears to be regulated by multiple cholesterol transporters^{8,18}. At the basolateral side of the enterocyte, we have shown that both statins and PCSK9 can modulate the TICE¹⁸. Indeed, PCSK9-deficient mice display an increased TICE compared to wild-type littermates, while acute PCSK9 intravenous injection decreases intestinal LDLR content and conversely reduces TICE¹⁸. At the apical side, it has been reported that ABCG5/ABCG8 deficiency only reduces by 40% the apical intestinal cholesterol efflux⁸, whereas it almost fully blocks biliary cholesterol secretion. This apical mechanistically redundancy has been further proven by studies showing that ABCB1 contributes to 20% of the apical cholesterol efflux^{8,18} and that the pharmacological inhibition of NPC1L1 by ezetimibe significantly increases TICE^{9,23}. In the present work, a drastic induction of PCSK9 mRNA levels in the three intestinal limbs (biliary, alimentary and common) was observed following RYGB, with a concomitant slight LDLR mRNA levels reduction in the biliary limb. Furthermore, RYGB did not modify ABCG5, ABCG8 and NPC1L1 gene expression in the three intestinal limbs. Taken together, our data suggest that a regulation of the known TICE modulators, at least at the transcriptional level, seems to be not involved in the induction of the TICE following RYGB. Additional transcriptomic and/or proteomic studies are warranted to identify such new modulators of TICE in the context of RYGB. Similarly, it is difficult to dissociate the relative contribution of TICE and cholesterol malabsorption in the RYGB induced hypocholesterolemic effect as both pathways are interconnected.

The increased intestinal PCSK9 gene expression observed five weeks after RYGB is intriguing. It has been suggested that PCSK9 is critical for liver regeneration after hepatectomy. Indeed, hepatic PCSK9 mRNA levels are strongly induced in days following partial hepatectomy and PCSK9-deficient mice exhibit impaired liver regeneration²⁴. Intestinal remodelling, especially hyperplasia, is known to occur after either mini gastric Bypass or RYGB, with increased jejunum diameter, higher villi, and deeper crypts than in sham rats²⁵. We also noticed such microscopic changes in the three limbs (*data not shown*). Thus, one could hypothesize that PCSK9 may play a role in the intestinal cell proliferation and

regeneration after RYGB. The metabolic consequences of bariatric surgeries in PCSK9-deficient mice are currently under investigation to assess the functional role of such increased intestinal PCSK9 expression.

In addition to the contribution of the TICE in the hypocholesterolemic phenotype following RYGB, we also highlighted a significant reduction of the intestinal ability to absorb cholesterol. These results are in agreement with the literature. Pihlajamäki et al. first found a 26% decrease in intestinal cholesterol absorption one year after RYGB in humans²⁶. Similar results were confirmed later by Benetti et al.²⁷. As potential mechanistic explanations, it is well admitted that RYGB delays the contact between bile salts and the dietary bolus, impairing micelle formation and reducing the time of exposure for nutrients with intestinal absorption area. We next determined whether RYGB can alter the gene expression of intestinal cholesterol transporters. As detailed before, neither NPC1L1 nor ABCG5/ABCG8 gene expression are altered in the small intestine from RYGB operated mice. In contrast, CD36 and SR-BI mRNA levels are reduced in the alimentary limb after RYGB. The functional importance of SR-BI in cholesterol absorption is still controversial with discrepant results obtained from either *in vitro* or mouse studies²⁸⁻³⁰. In accordance with a potential link between decreased intestinal CD36 expression and reduced cholesterol intestinal absorption, Nauli et al. reported that CD36-deficient mice showed a significant reduction of lymphatic transport of dietary cholesterol³¹.

We found that plasma bile acids were drastically increased following RYGB in mice. These data are in accordance with others studies reporting significant increase in plasma bile acids in different species such as humans³²⁻³⁴, rats³⁴⁻³⁶ and pigs³⁴. In humans, the rise in plasma bile acids in obese patients following bariatric surgeries strongly correlates with improved glucose tolerance and lipid metabolism^{32,37}. Mouse models demonstrated that the nuclear receptor FXR is required for mediating the beneficial effect of SG on glucose homeostasis, potentially via changes in gut microbiota¹². In our model, we did not measure significant changes in hepatic expression of key genes of bile acid metabolism such as FXR,

SHP and CYP7A1. However, it would be interesting to study whether RYGB can affect cholesterol metabolism in FXR-deficient mice. Another potential link between bile acids and cholesterol metabolism is the regulation of TICE. If neither the luminal bile acid concentration nor bile acid hydrophobicity seems to affect TICE³⁸, it was recently reported that the pharmacological FXR activation strongly activates TICE³⁹. Finally, it has been previously demonstrated that hydrophobic bile acids, such as CA and DCA, induce intestinal cholesterol absorption whereas hydrophilic bile acids, such as MCAs, can strongly repress it⁴⁰. More work will be required to fully characterize the impact of bile acids alteration on the cholesterol metabolism change observed after RYGB.

CONCLUSION

We developed two models of bariatric surgeries in mice that resume the hypocholesterolemic effect observed in patients operated of SG or RYGB. Our data show that SG had a weak and transient effect on cholesterolemia that seems mostly due to food intake reduction. By contrast, RYGB exerts a strong and sustained hypocholesterolemic action. RYGB strongly favors plasma cholesterol elimination by concomitantly increasing TICE and by decreasing intestinal cholesterol absorption. From a clinical perspective, these data suggest that malabsorptive procedures (RYGB) should be preferred in obese patients with established hypercholesterolemia and/or high cardiovascular risk.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

We thank Marie Liabeuf and Stephanie Lemarchand-Minde (Animal facility, l'Institut du Thorax, Nantes, France) for their help in the setting of the animals care protocol. This work

was supported by grants from « La région des Pays de la Loire », the « fondation d'avenir », the Casden bank, the AFC, the Fondation Leducq Grant (13CVD03).

Statement of authors contributions

The authors contributed in the following way: CB, FM, BC, CLM: designed the study; CB, FM, AA, LT, FB, DG, LA, AA, MC, MK, CLM: performed the experiments and collected the data; CB, FM, AA, LT, FB, DG, XP, MN, BC, CLM: Analysed the data and arranged the figures; CB, BC, CLM: wrote the first draft of the manuscript. FM, XP, MN: initially reviewed the manuscript. All authors edited and approved the final draft of the manuscript.

References

- 1 Berghöfer A, Pischon T, Reinhold T, Apovian CM, Sharma AM, Willich SN. Obesity prevalence from a European perspective: a systematic review. *BMC Public Health* 2008 ; **8** : 200.
- 2 Fontaine, KR, Redden, DT, Wang, C, Westfall, AO, Allison DB. Years of life lost due to obesity. *JAMA* 2003 ; **289** : 187-193.
- 3 Buchwald, H, Oien, DM. Metabolic/bariatric surgery Worldwide 2008. *Obes Surg* 2009 ; **19** : 1605-1611.
- 4 Buchwald H, Avidor Y, Braunwald E, Jensen MD, Pories W, Fahrbach K *et al.* Bariatric surgery: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* 2004 ; **292** : 1724-1737.
- 5 Kruit JK, Groen AK, van Berkel TJ, Kuipers F. Emerging roles of the intestine in control of cholesterol metabolism. *World J Gastroenterol* 2006 ; **12** : 6429-6439.
- 6 Temel RE, Brown JM. A new model of reverse cholesterol transport: enTICEing strategies to stimulate intestinal cholesterol excretion. *Trends Pharmacol Sci* 2015 ; **36** : 440-451.
- 7 van der Velde AE, Vrans CL, Van den Oever K, Kunne C, Oude Elferink RP, Kuipers F *et al.*, Direct intestinal cholesterol secretion contributes significantly to total fecal neutral sterol excretion in mice. *Gastroenterology* 2007 ; **133** : 967-975.
- 8 van der Veen JN, van Dijk TH, Vrans CL, van Meer H, Havinga R, Bijsterveld K *et al.* Activation of the liver X receptor stimulates trans-intestinal excretion of plasma cholesterol. *J Biol Chem* 2009 ; **284** : 19211-19219.
- 9 Jakulj L, van Dijk TH, Freark de Boer J, Kootte RS, Schonewille M, Paalvast Y *et al.* Transintestinal Cholesterol Transport Is Active in Mice and Humans and Controls Ezetimibe-Induced Fecal Neutral Sterol Excretion. *Cell Metab* 2016 ; **6** : 783-794.
- 10 Yin DP, Gao Q, Ma LL, Yan W, Williams PE, McGuinness OP *et al.* Assessment of different bariatric surgeries in the treatment of obesity and insulin resistance in mice. *Ann Surg* 2011 ; **254** : 73-82.
- 11 Troy S, Soty M, Ribeiro L, Laval L, Migrenne S, Fioramonti X *et al.* Intestinal gluconeogenesis is a key factor for early metabolic changes after gastric bypass but not after

gastric lap-band in mice. *Cell Metab* 2008 ; **8** : 201-211.

12 Ryan KK, Tremaroli V, Clemmensen C, Kovatcheva-Datchary P, Myronovych A, Karns R *et al.* FXR is a molecular target for the effects of vertical sleeve gastrectomy. *Nature* 2014 ; **509** : 183-188.

13 Hao Z, Mumphrey MB, Townsend RL, Morrison CD, Münzberg H, Ye J *et al.* Body Composition, Food Intake, and Energy Expenditure in a Murine Model of Roux-en-Y Gastric Bypass Surgery. *Obes Surg* 2016 ; **26** : 2173-2182.

14 Stefater MA, Sandoval DA, Chambers AP, Wilson-Pérez HE, Hofmann SM, Jandacek R *et al.* Sleeve gastrectomy in rats improves postprandial lipid clearance by reducing intestinal triglyceride secretion. *Gastroenterology* 2011 ; **141** : 939-949.e1-4.

15 Myronovych A, Kirby M, Ryan KK, Zhang W, Jha P, Setchell KD *et al.* Vertical sleeve gastrectomy reduces hepatic steatosis while increasing serum bile acids in a weight-loss-independent manner. *Obesity (Silver Spring)* 2014 ; **22** : 390-400.

16 Pressler JW, Haller A, Sorrell J, Wang F, Seeley RJ, Tso P *et al.* Vertical sleeve gastrectomy restores glucose homeostasis in apolipoprotein A-IV KO mice. *Diabetes* 2015 ; **64** : 498-507.

17 Ayer A, Borel F, Moreau F, Prieur X, Neunlist M, Cariou B *et al.* Techniques of Sleeve Gastrectomy and Modified Roux-en-Y Gastric Bypass in Mice. *J Vis Exp* 2017 ; **20** :121.

18 Le May C, Berger JM, Lespine A, Pillot B, Prieur X, Letessier E *et al.* Transintestinal cholesterol excretion is an active metabolic process modulated by PCSK9 and statin involving ABCB1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013 ; **33** : 1484-1493.

19 Nik AM, Carlsson P. Separation of intact intestinal epithelium from mesenchyme. *Biotechniques* 2013 ; **55** : 42-44.

20 Si-Tayeb K, Idriss S, Champon B, Caillaud A, Pichelin M, Arnaud L *et al.* Urine-sample-derived human induced pluripotent stem cells as a model to study PCSK9-mediated autosomal dominant hypercholesterolemia. *Dis Model Mech* 2016 ; **9** : 81-90.

21 Yu L, Hammer RE, Li-Hawkins J, Von Bergmann K, Lutjohann D, Cohen JC *et al.*

Disruption of Abcg5 and Abcg8 in mice reveals their crucial role in biliary cholesterol secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002 ; **99** : 16237-16242.

22 Flynn CR, Albaugh VL, Cai S, Cheung-Flynn J, Williams PE, Brucker RM *et al.* Bile diversion to the distal small intestine has comparable metabolic benefits to bariatric surgery. *Nat Commun* 2015 ; **6** : 7715

23 Jakulj L, Vissers MN, van Roomen CP, van der Veen JN, Vrins CL, Kunne C *et al.* Ezetimibe stimulates faecal neutral sterol excretion depending on abcg8 function in mice. *FEBS Lett* 2010 ; **584** : 3625-3628.

24 Zaid A, Roubtsova A, Essalmani R, Marcinkiewicz J, Chamberland A, Hamelin J *et al.* Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9): hepatocyte-specific low-density lipoprotein receptor degradation and critical role in mouse liver regeneration. *Hepatology* 2008 ; **48** : 646-654.

25 Cavin JB, Voitellier E, Cluzeaud F, Kapel N, Marmuse JP, Chevallier JM *et al.* Malabsorption and intestinal adaptation after one anastomosis gastric bypass compared with Roux-en-Y gastric bypass in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2016 ; **311** : G492-G500.

26 Pihlajamäki J, Grönlund S, Simonen M, Käkelä P, Moilanen L, Pääkkönen, M *et al.* Cholesterol absorption decreases after Roux-en-Y gastric bypass but not after gastric banding. *Metabolism* 2010 ; **59** : 866-872.

27 Benetti A, Del Puppo M, Crosignani A, Veronelli A, Masci E, Frigè F *et al.* Cholesterol metabolism after bariatric surgery in grade 3 obesity: differences between malabsorptive and restrictive procedures. *Diabetes Care* 2013 ; **36** : 1443-1447.

28 Mardones P, Quiñones V, Amigo L, Moreno M, Miquel JF, Schwarz M *et al.* Hepatic cholesterol and bile acid metabolism and intestinal cholesterol absorption in scavenger receptor class B type I-deficient mice. *J Lipid Res* 2001 ; **42** : 170-180.

29 Cai L, Eckhardt ER, Shi W, Zhao Z, Nasser M, de Villiers WJ *et al.* Scavenger receptor class B type I reduces cholesterol absorption in cultured enterocyte CaCo-2 cells. *J Lipid Res* 2004 ; **45** : 253-262.

- 30 Bietrix F, Yan D, Nauze M, Rolland C, Bertrand-Michel J, Coméra C *et al.* Accelerated lipid absorption in mice overexpressing intestinal SR-BI. *J Biol Chem* 2006 ; **281** : 7214-7219.
- 31 Nauli AM, Nassir F, Zheng S, Yang Q, Lo CM, Vonlehmden SB *et al.* CD36 is important for chylomicron formation and secretion and may mediate cholesterol uptake in the proximal intestine. *Gastroenterology* 2006 ; **131** : 1197-1207.
- 32 Patti ME, Houten SM, Bianco AC, Bernier R, Larsen PR, Holst JJ *et al.* Serum bile acids are higher in humans with prior gastric bypass: potential contribution to improved glucose and lipid metabolism. *Obesity (Silver Spring)* 2009 ; **17** : 1671-1677.
- 33 Jansen PL, van Werven J, Aarts E, Berends F, Janssen I, Stoker J *et al.* Alterations of hormonally active fibroblast growth factors after Roux-en-Y gastric bypass surgery. *Dig Dis* 2011 ; **29** : 48-51.
- 34 Spinelli V, Lalloyer F, Baud G, Osto E, Kouach, M, Daoudi M *et al.* Influence of Roux-en-Y gastric bypass on plasma bile acid profiles: a comparative study between rats, pigs and humans. *Int J Obes (Lond)* 2016 ; **40** : 1260-1267.
- 35 Bhutta HY, Rajpal N, White W, Freudenberg JM, Liu Y, Way J *et al.* Effect of Roux-en-Y gastric bypass surgery on bile acid metabolism in normal and obese diabetic rats. *PLoS One* 2015 ; **10** : e0122273.
- 36 Gao F, Zhang X, Zhou L, Zhou S, Zheng Y, Yu J *et al.* Type 2 diabetes mitigation in the diabetic Goto-Kakizaki rat by elevated bile acids following a common-bile-duct surgery. *Metabolism* 2016 ; **65** : 78-88.
- 37 Ahmad NN, Pfalzer A, Kaplan LM. Roux-en-Y gastric bypass normalizes the blunted postprandial bile acid excursion associated with obesity. *Int J Obes (Lond)* 2013 ; **37** : 1553-1559.
- 38 van der Velde AE, Vrins CL, van den Oever K, Seemann I, Oude Elferink RP, van Eck M *et al.* Regulation of direct transintestinal cholesterol excretion in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008 ; **295** : G203-G208.
- 39 de Boer JF, Schonewille M, Boesjes M, Wolters H, Bloks VW, Bos T *et al.* Intestinal

Farnesoid X Receptor Controls Transintestinal Cholesterol Excretion in Mice. *Gastroenterology* 2017 ; **152** : 1126-1138.e6.

40 Wang DQ, Tazuma S, Cohen DE, Carey MC. Genetic factors at the enterocyte level account for variations in intestinal cholesterol absorption efficiency among inbred strains of mice. *J Lipid Res* 2003 ; **285** : G494-G502.

41 Le May C, Kourimate S, Langhi C, Chétiveaux M, Jarry A, Comera C *et al.* Proprotein convertase subtilisin kexin type 9 null mice are protected from postprandial triglyceridemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009 ; **29** : 684-690.

SUPPLEMENTARY MATERIAL ONLINE

Supplementary Materials and Methods

Figure S1. Schematic representation of (A) Sleeve Gastrectomy (SG) and (B) modified Roux en Y Gastric Bypass (RYGB).

Figure S2. Effect of RYGB on plasma lipoprotein pattern

Effect of Bypass surgery on hepatic gene expression

Table 1

		Sham	RYGB
Cholesterol metabolism	SREBP2	1,00 ± 0,09	1,40 ± 0,26
	HMGCoA reductase	1,00 ± 0,12	0,96 ± 0,33
	LDLR	1,00 ± 0,07	0,38 ± 0,12*
LDLR Inhibitor	PCSK9	1,00 ± 0,11	2,13 ± 0,49*
	IDOL	1,00 ± 0,08	1,01 ± 0,09
Remnants metabolism	LRP1	1,00 ± 0,09	1,01 ± 0,10
	CD36	1,00 ± 0,09	0,47 ± 0,07*
	ABCA1	1,00 ± 0,13	1,44 ± 0,10*
Biliary cholesterol Excretion	ABCG5	1,00 ± 0,05	0,37 ± 0,13*
	ABCG8	1,00 ± 0,08	0,58 ± 0,19
	CYP7A1	1,00 ± 0,21	0,81 ± 0,30
Bile acids metabolism	FXR	1,00 ± 0,09	1,23 ± 0,11
	SHP	1,00 ± 0,13	1,25 ± 0,21

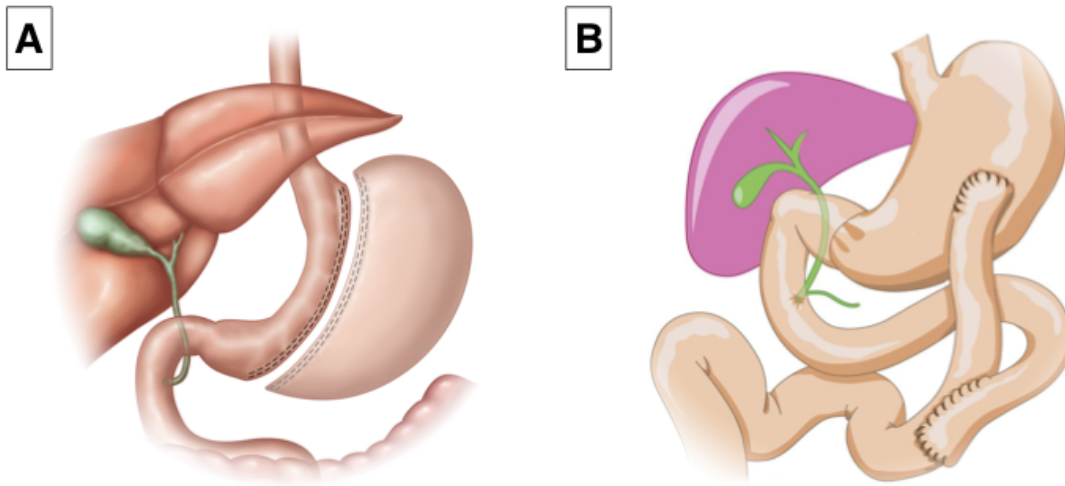
Table 1: Q-PCR analysis of hepatic gene expression after RYGB. mRNA levels are normalized to cyclophilin mRNA levels. Values are means ± SEM and are standardized to values measured in the sham group arbitrary set to 1. $p < 0.05$; Mann-Whitney test between Sham and RYGB groups. $n = 7$ per group.

Effect of Bypass surgery on intestinal gene expression**Table 2**

	Alimentary limb		Biliary limb		Common limb	
	Sham	RYGB	Sham	RYGB	Sham	RYGB
PCSK9	1.00 ± 0.18	12.47 ± 2.29 *	1.00 ± 0.12	2.53 ± 0.72 *	1.00 ± 0.13	13.13 ± 4.43 *
LDLR	1.00 ± 0.07	1.32 ± 0.25	1.00 ± 0.08	0.57 ± 0.14 *	1.00 ± 0.05	1.11 ± 0.23
NPC1L1	1.00 ± 0.18	1.60 ± 0.28	1.00 ± 0.31	1.24 ± 0.60	1.00 ± 0.19	1.86 ± 0.51
ABCG5	1.00 ± 0.13	0.87 ± 0.13	1.00 ± 0.19	1.03 ± 0.16	1.00 ± 0.13	1.33 ± 0.22
ABCG8	1.00 ± 0.17	0.73 ± 0.16	1.00 ± 0.24	0.93 ± 0.17	1.00 ± 0.22	1.28 ± 0.24
CD36	1.00 ± 0.12	0.37 ± 0.16 *	1.00 ± 0.26	0.53 ± 0.10	1.00 ± 0.18	1.08 ± 0.26
SRBI	1.00 ± 0.21	0.18 ± 0.02 *	1.00 ± 0.22	1.98 ± 0.58	1.00 ± 0.22	0.92 ± 0.23

Table 2: Q-PCR analysis of intestinal gene expression after RYGB. mRNA levels are normalized to cyclophilin mRNA levels. Values are means ± SEM and are standardized to values measured in the sham group arbitrary set to 1. p<0.05; Mann-Whitney test between Sham and RYGB groups. n=7 per group.

Figure S1



Schematic views of (A) Sleeve gastrectomy and (B) modified Roux en Y Gastric Bypass

Figure S1: Schematic representation of (A) Sleeve Gastrectomy (SG) and (B) modified Roux en Y Gastric Bypass (RYGB).

Figure S2

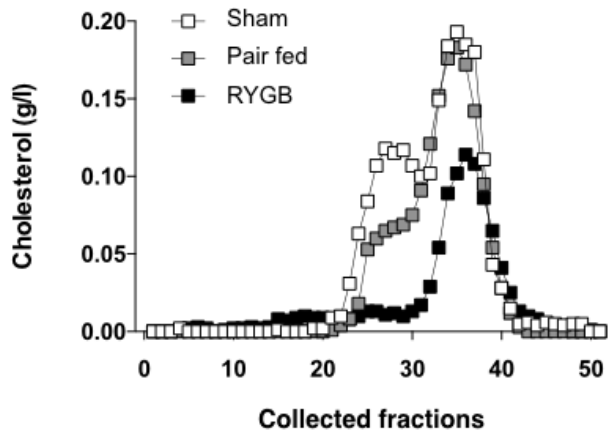


Figure S2: Effect of RYGB on plasma lipoprotein pattern. Plasma lipoproteins profile from pooled mouse samples (n=8/per group) were resolved by Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC).

Figure 3

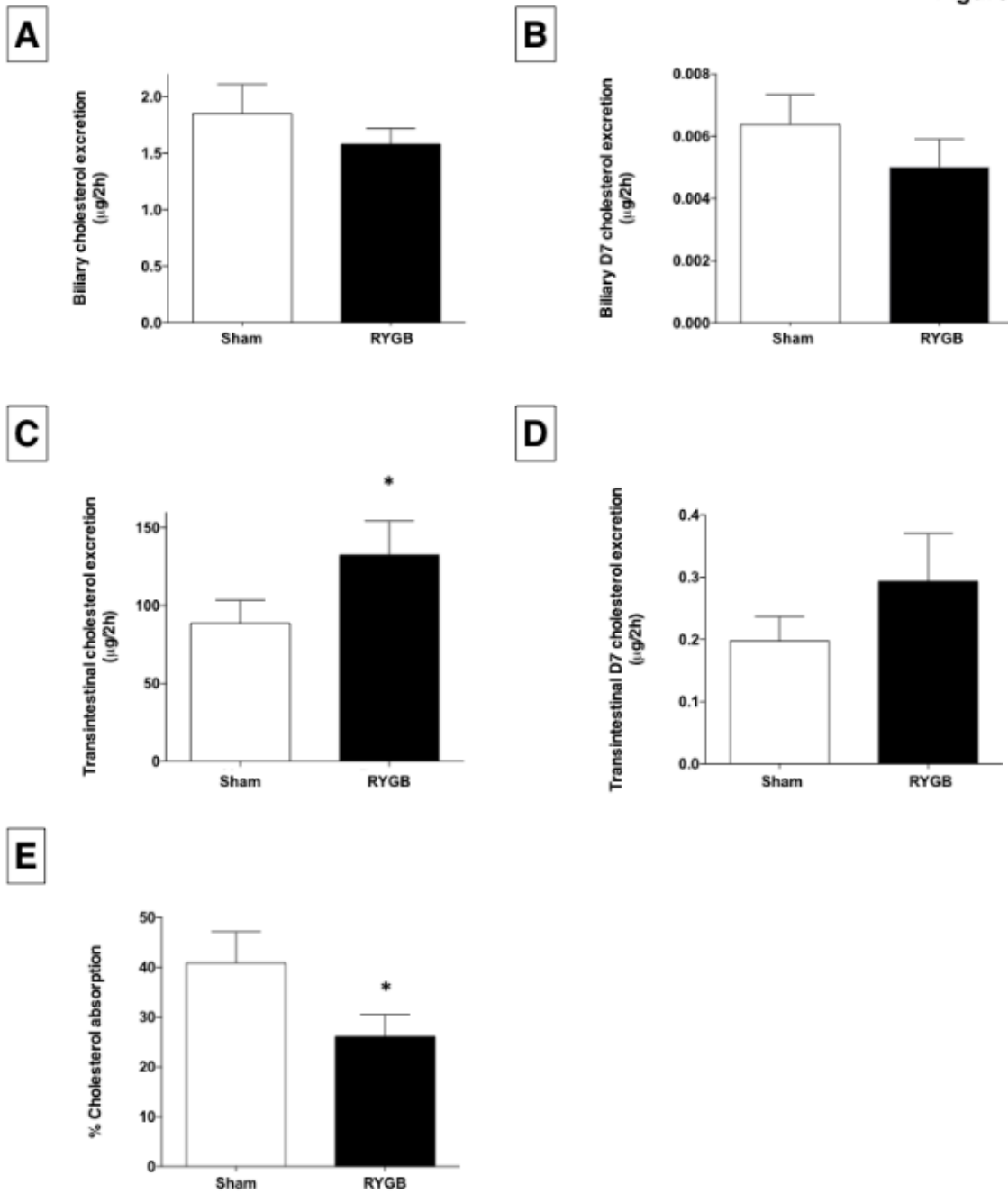


Figure S3: Effect of RYGB on daily food intake. Data are shown as mean value ± SEM. * p<0.05; *** p<0.001, Mann-Whitney test between sham and SG and RYGB groups. Sham n=14; RYGB n=19.

Sleeve Gastrectomy Alters Intestinal Permeability in Diet-Induced Obese Mice

Cette étude vise à déterminer les conséquences de la sleeve sur les fonctions digestives telles que la perméabilité intestinale. De nombreuses études ont établi que l'obésité était fréquemment associée à des complications métaboliques telles que le DT2. Un des mécanismes mis en avant dans certaines études consiste à expliquer la dégradation du profil métabolique par une altération de la perméabilité intestinale associée à une inflammation [472] [473]. Nous avons ainsi souhaité déterminer si la sleeve module la perméabilité intestinale et par conséquent limite l'inflammation induite par la translocation du LPS.

Nos résultats démontrent que la sleeve réduit la prise de poids et améliore le profil métabolique. Ces résultats s'associent à une augmentation, *in vivo*, de la perméabilité para-cellulaire intestinale. De façon surprenante, la perméabilité est réduite dans la partie proximale de l'intestin mais augmentée dans la partie distale. Les niveaux plasmatiques de LPS sont augmentés ainsi que les marqueurs de l'inflammation dans le foie et le tissu adipeux. La sleeve, malgré l'induction d'une inflammation locale, permet cependant d'améliorer le profil glycémique.



Sleeve Gastrectomy Alters Intestinal Permeability in Diet-Induced Obese Mice

Claire Blanchard^{1,2} · François Moreau³ · Julien Chevalier⁴ · Audrey Ayer³ · Damien Garcon³ · Lucie Arnaud³ · Jean-Paul Pais de Barros⁵ · Thomas Gautier⁵ · Michel Neunlist^{4,6} · Bertrand Cariou¹ · Cédric Le May³

© Springer Science+Business Media New York 2017

Abstract

Background Increased lipopolysaccharide (LPS) translocation due to altered intestinal permeability has been suggested as a mechanism for obesity-associated insulin resistance. The goal of this study was to assess the effect of sleeve gastrectomy (SG) on intestinal barrier permeability in diet-induced obese mice.

Materials and Methods Four weeks after surgery, the effects of SG on intestinal permeabilities were assessed ex vivo and in vivo in male C57Bl/6J mice fed a high-fat diet. Gene expression of tight junction proteins and inflammatory cytokines was measured in jejunum, colon, liver, and inguinal adipose tissue. Plasma LPS was quantified by HPLC/MS spectrometry.

Results SG significantly reduced body weight and improved glucose homeostasis, as expected. SG decreased paracellular ($p = 0.01$) and transcellular permeability ($p = 0.03$) in the jejunum; and increased mRNA levels of the tight junction proteins Jam A ($p = 0.02$) and occludin ($p = 0.01$). In contrast

in the distal colon, paracellular permeability tended to be increased ($p = 0.07$) while transcellular permeability was significantly induced ($p = 0.03$) after SG. In vivo, the paracellular permeability was significantly increased 3 weeks after SG ($p = 0.02$). Plasma LPS level were increased after SG ($p = 0.03$), as well as mRNA levels of adipose and hepatic inflammatory markers ($p = 0.02$).

Conclusions SG significantly modifies intestinal permeability in a differential manner between the proximal and distal intestine. These changes promote LPS translocation in plasma, induce a low-grade pro-inflammatory state in adipose tissue and liver, but do not impair the SG-induced glucose homeostasis improvement.

Keywords Sleeve gastrectomy · LPS · Intestinal permeability · Inflammation · Glucose homeostasis

Introduction

Morbid obesity is frequently associated with metabolic complications, such as type 2 diabetes mellitus (T2DM). Among bariatric procedures, sleeve gastrectomy (SG) is the most frequently used in many countries. Randomized prospective studies have demonstrated that bariatric surgery is an efficient strategy to improve glycemic control or even cure T2DM [1]. Several molecular mechanisms sustain these beneficial effects of bariatric surgery, including stimulation of incretin secretion and modulation of bile acid signaling [2]. Previous works suggested that alterations in intestinal permeability could underlie the metabolic complications of obesity. In rodents, several studies built the concept that the consumption of a high-fat diet induces microbiome modifications, decreases the expression of tight junction proteins, and increases intestinal permeability that favors plasma LPS translocation [3–8].

✉ Claire Blanchard
Claire.blanchard@chu-nantes.fr

¹ l'Institut du Thorax, INSERM, CNRS, CHU Nantes, University of Nantes, Nantes, France

² Clinique de Chirurgie Digestive et Endocrinienne, CHU Hôtel Dieu, 1 place Alexis Ricordeau, 44093 cedex 1 Nantes, France

³ L'institut du Thorax, INSERM-CNRS, University of Nantes, Nantes, France

⁴ INSERM U913, 44093 Nantes, France

⁵ Plateforme de Lipidomique-uBourgogne, INSERM UMR866 / LabEx LipSTIC, Dijon, France

⁶ Institut des Maladies de l'Appareil Digestif, CHU Nantes, Nantes, France

Accordingly, increased intestinal permeability induces a chronic inflammatory response and promotes systemic insulin resistance [3, 8–10].

In humans, the effects of obesity and bariatric surgery on intestinal permeability have been poorly explored and have produced varying results [11]. In healthy subjects, a positive correlation was observed between the permeability of the colon and the amount of visceral fat [12]. One team reported that no change in intestinal permeability occurs in the presence of obesity [13], but did observe a slight increase in intestinal permeability in obese patients in a subsequent study [14]. A third study showed that obese patients display increased gastroduodenal permeability but no differences in the permeability of the small intestine or the colon [15]. Intestinal permeability, as measured by the lactulose/mannitol ratio, was not significantly altered in patients 6 months after RYGB [16]. However, a significant increase in claudin 3 and 4 levels was found 8 months after RYGB, whereas occludin and ZO-1 levels decreased in this timeframe [17].

Based on these discordant results, our study aims to assess the short-term effects of SG on intestinal paracellular and transcellular permeabilities and the subsequent effects on LPS translocation, white adipose tissue and hepatic inflammation, and glucose homeostasis in diet-induced obese mice.

Materials and Methods

Animals

Ten-week-old C57Bl/6 mice (Charles River) had free access to water and high-fat diet for 8 weeks prior to surgery (DIO diet 35% kcal from fat, Safe). As the maximal metabolic benefit appears to be reached 3 to 4 weeks after bariatric procedures [18], we did measure the functional consequence of SG on intestinal permeability during this period. All experiments were approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of Pays de la Loire (study n° 01953.01).

Surgical Procedures

Prior surgery, mice were matched on body weight and plasma cholesterol and divided in three experimental groups. Sham and Pairfed control mice were only subjected to a sham operation (laparotomy and mobilization of the stomach). Sham and SG mice were fed ad libitum when Pairfed mice received the same amount of food consumed by the SG mice 24 h before. A SG

was performed as follows on the third group of mice. After laparotomy, the stomach was externalized, and the pylorus vessels were sutured along the greater stomach curvature with 8.0 Prolene single sutures (Ethicon®, Johnson & Johnson). Then, a gastrostomy was performed on the anatomical line present between the pyloric region and the cardiac region of the stomach and the incision site was sutured with 8.0 Prolene using a running suture from the gastro-esophageal junction. Eighty percent of the stomach was removed. The muscle layer of the abdominal wall and the skin was closed using interrupted sutures with 5.0 Prolene. After surgery, isoflurane was stopped and O₂ flow (0.8 L/min) was continued until the mice were fully recovered. Mice were individually housed in a 30 °C incubator for the next 5 days. All groups had free access to Highfat Geldiet (lard 10%, liquid sugar 10%, water 57%; Safe) for 5 days and the DIO diet was reintroduced 3 days after surgery. Buprenorphine (0.1 mg/kg, twice daily), meloxicam (1 mg/kg), and marbofloxacin (10 mg/kg) were subcutaneously administered for 3 days after surgery and metoclopramide (1 mg/kg) was maintained for 5 days.

Food Intake Measurement

The food intake was measured for each mouse daily for up to 4 weeks after surgery by substrating the uneaten food from a pre-weighed amount of solid diet placed in the cage 24 h before.

Oral Glucose Tolerance Test

Two weeks after surgery, 6-h-fasted mice received an oral bolus of D-glucose (2 g/kg) and plasma glucose levels were measured at 0, 15, 30, 60, and 120 min after gavage by tail bleeding (Glucometer-One Touch Verio®).

Total Transit Time and Colonic Motility Measurement

Total transit time (TTT) and colonic motility were evaluated as previously reported [19]. Mouse was housed in individual cage, and produced feces were harvested every 15 min for 2 h. The fecal water content was estimated by subtracting the fresh fecal weight by the dry fecal weight (after feces lyophilization).

Intestinal Permeability Assessment

In vivo intestinal barrier function was assessed by measuring the paracellular transport of fluorescein-conjugated sulfonic acid (F-SA) in plasma [19]. Ex

Table 1 Table of used primers

Gene	Protein name	Forward primer	Reverse primer
ZO1	Zonula Occludens	1 AAGAATATGGTCTTCGATTGGC	ATTTTCTGTCACAGTACCATTATCTTC
Occludin	Occludin	GGTAAAAATGTGTCTGCAGG	GAGGCTGCCTGAAGTCATCCA
JAM A	Junctional Adhesion Molecule A	ATAACAGCCAGATCACAGCTCC	TGGAGGTACAAGCACAGTGAG
IFN γ	Interferon Gamma	CTGGAGGAACTGGCAAAGGAT	GGTTGTTGACCTCAAACCTGGC
TNF α	Tumor Necrosis Factor alpha	GAACTTCGGGGTGATCGGTCC	GCCACTCCAGCTGCTCCTCC
IL1B	Interleukine 1 beta	TCCTGTGTGATGAAAGACGGCAC	GTGCTGATGTACCAGTTGGGGAAAC
S6 ribosomal	protein S6	GAAGCGCAAGTCTGTTCTGTG	GTCTGGGCTTCTTACCTTC
SAA1 Serum	amyloide A1	CCCAGACTCTGCAAATCTCATTC	AAAGCTCTCTCTTGATCACTG
SAA2 Serum	amyloide A2	ACCTGTGGTTCGGAGGATGAA	TGGCTGGAAAGATGGAGACAA
SAA3 Serum	amyloide A3	TGCCATCATCTTTGCATCTTGA	CCGTGAACCTCTGAACAGCCT
SAA4 Serum	amyloide A3	CTCTGTCTTTGTTCTGGGAG	CTAGGTTGTCCCGATAGGCTC
Haptoglobin	Haptoglobin	GCTATGTGGAGCACTTGGTTC	CACCCATTGCTTCTCGTCGTT

vivo, jejunal, or colonic intestinal biopsies were mounted in Ussing chambers and paracellular and transcellular permeabilities were determined by respectively quantifying the incoming transport of F-SA and horseradish peroxidase (HRP) as described before [19].

mRNA Levels Analysis

Total RNA was extracted from tissues using NucleoSpin RNA II (Macherey Nagel). cDNA was synthesized using SuperScript III Reverse Transcriptase (Life Technologies). Real-time quantitative PCR

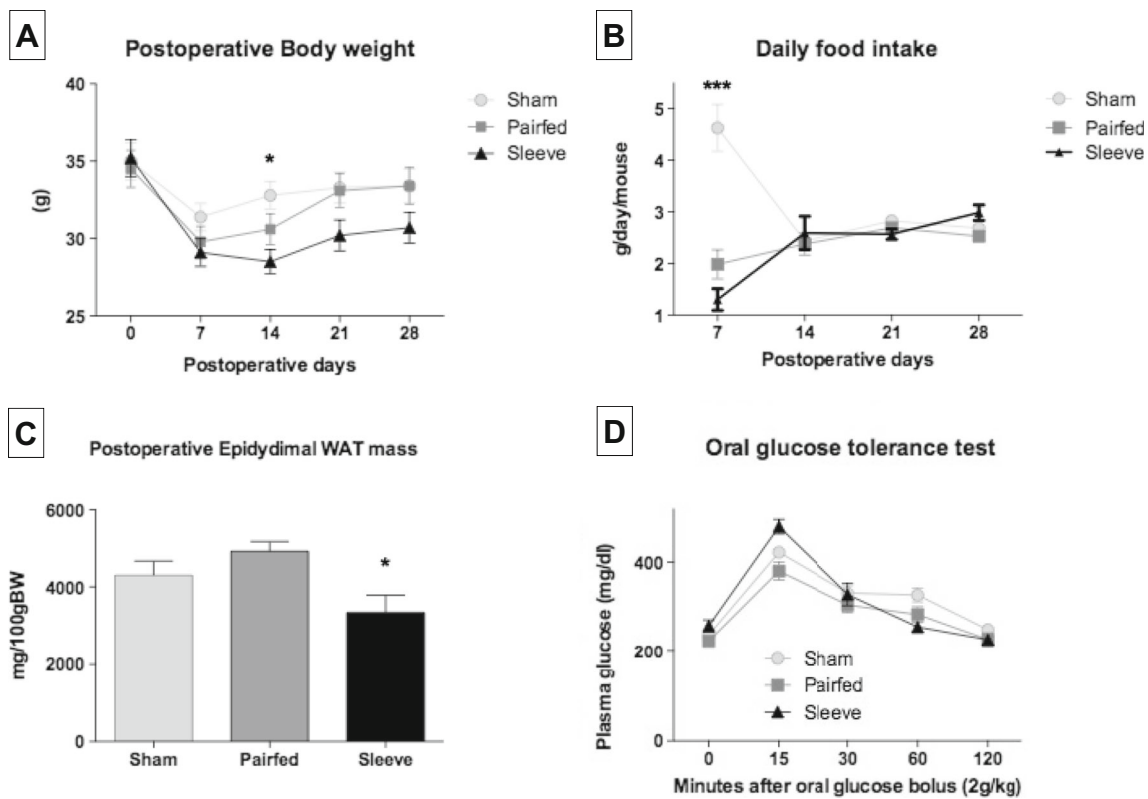


Fig. 1 Effect of sleeve gastrectomy (Sleeve) on body weight (a), on daily food intake (b), on epididymal WAT mass (c), and oral glucose tolerance. Data are mean values \pm SEM. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$

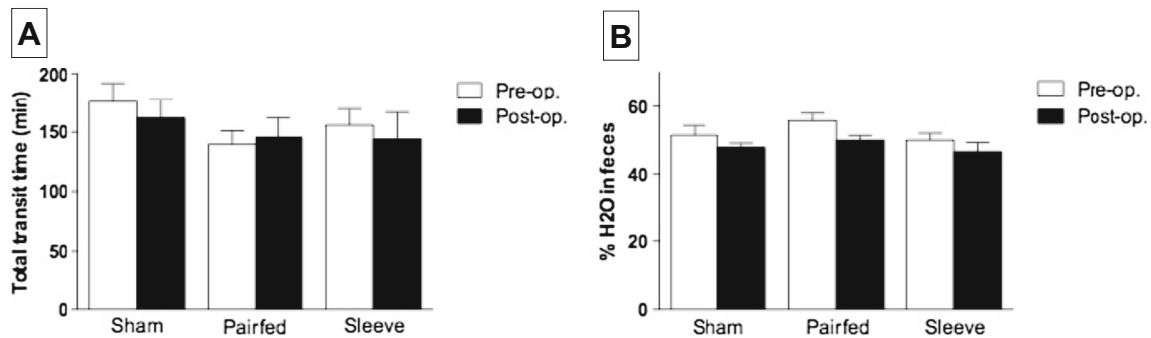


Fig. 2 Effect of sleeve on total transit time (a) and fecal water content (b). Histograms represent mean values \pm SEM. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$

(qPCR) was performed using primers described in Table 1 using Absolute Blue SYBR Green Fluorescein mix (Life Technologies), and reactions were run on a StepOne + thermocycler (Life Technologies).

Plasma LPS Measurement

Plasma LPS was separated by reverse-phase HPLC and quantitated by MS/MS spectrometry, as described before [20].

Fig. 3 Ex vivo measurement of the effect of sleeve on jejunal paracellular (a) and transcellular permeability (b). Consequences of sleeve on jejunal mRNA levels of Jam A (c), Occludin (d), and ZO-1 (e). Values are normalized with S6 and reported to values measured in the sham group arbitrarily set to 1. Data are means \pm SEM. * $p < 0.05$

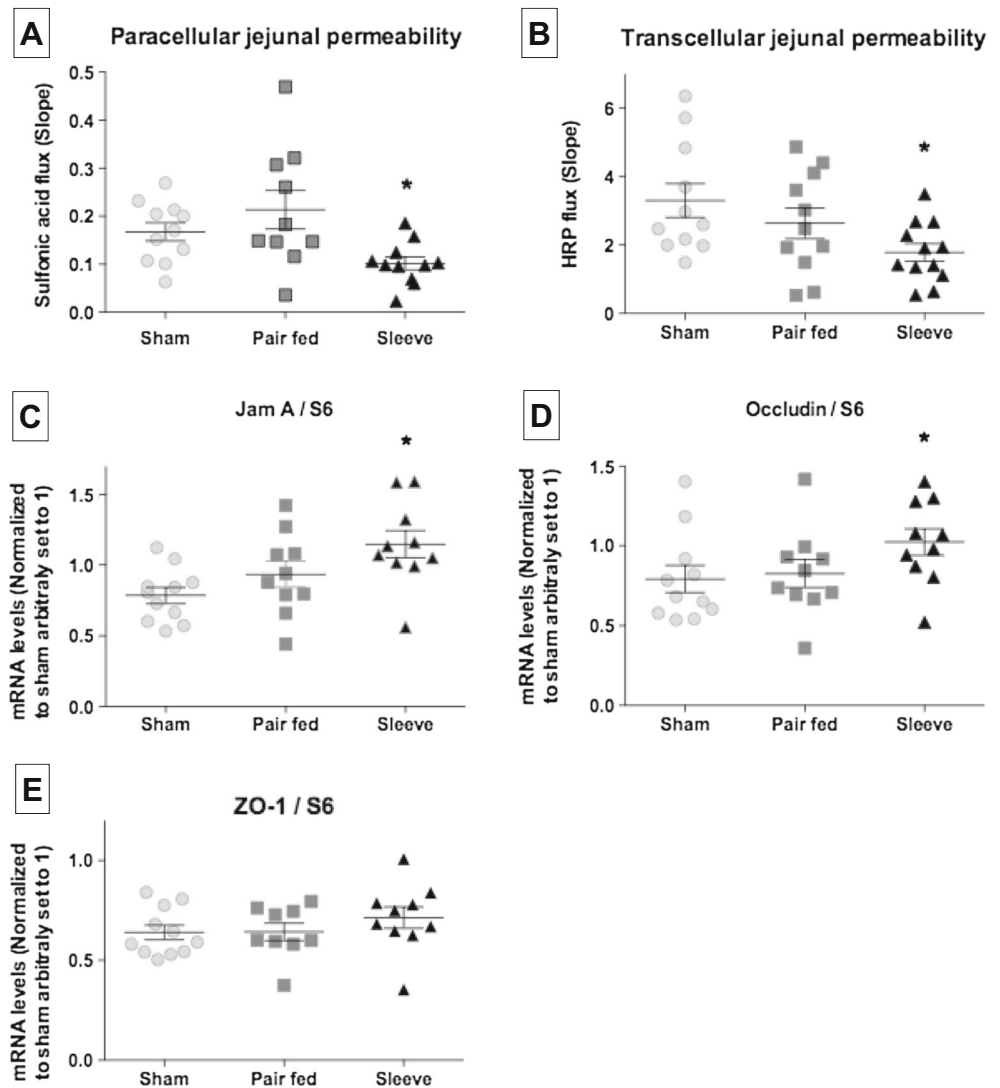
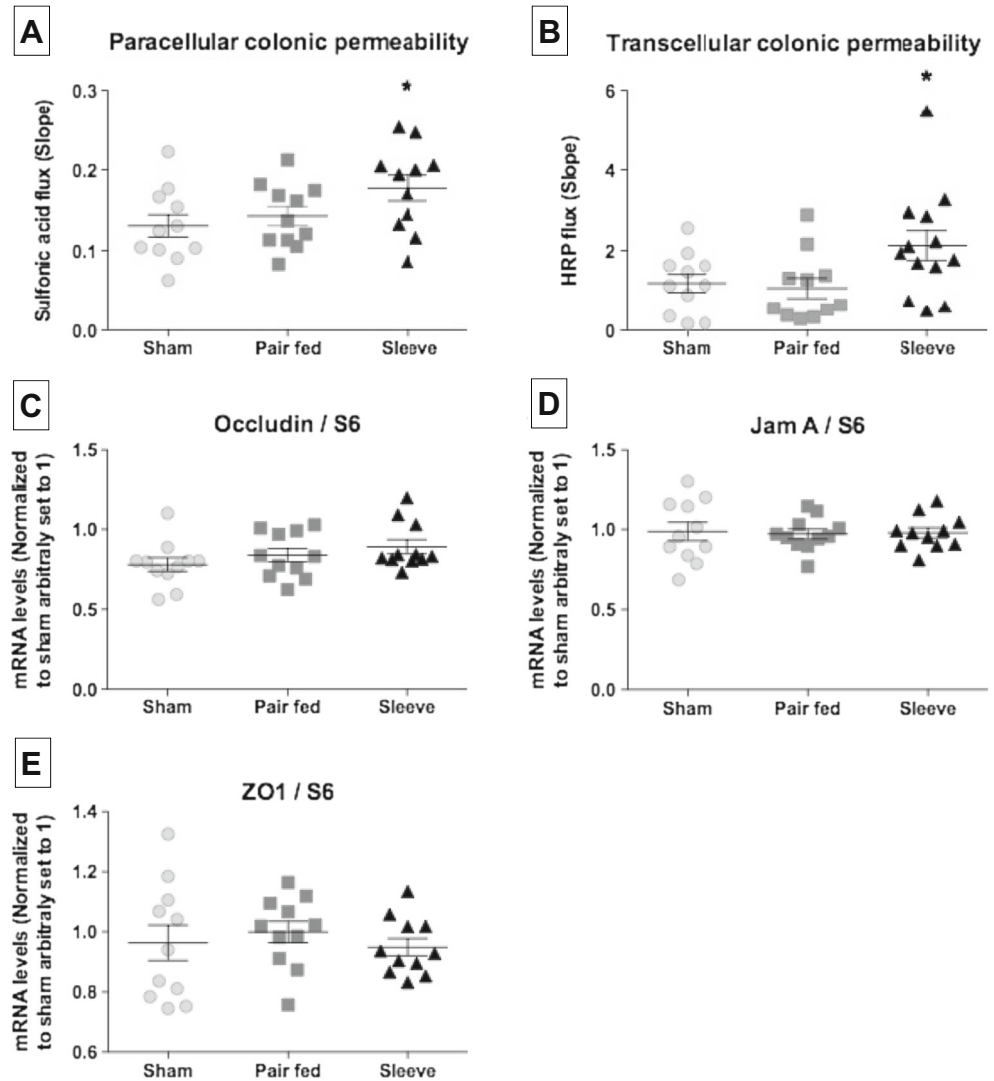


Fig. 4 Ex vivo measurement of the effect of sleeve on colonic paracellular (a) and transcellular permeability (b). Consequences of sleeve on colonic mRNA levels of Jam A (c), Occludin (d), and ZO-1 (e). Values are normalized with S6 and reported to values measured in the sham group arbitrarily set to 1. Data are means \pm SEM. * $p < 0.05$



Statistical Analysis

Statistical analysis was performed by Prism5 (GraphPad) using non parametric Mann-Whitney test or Kruskal–Wallis test followed by Dunn’s test.

Results

SG is an Efficient Procedure in Obese Mice

Eight weeks after a HFD, 40 male mice were randomized based on body weight and plasma total cholesterol and divided into 3 experimental groups (Sham, Pair-fed, SG). The average body weight before surgery was 35.8 ± 3.9 g. The average duration of the procedure was 41 ± 7 min. The survival rate was 86% after SG. Compared to baseline, SG led to significant reductions in body weight at 2 (-8% , $p = 0.03$) and 4 weeks post-surgery (-5.5% , $p = 0.13$, Fig. 1a). There was a

significant reduction in body weight in the SG group compared to the sham group on day 14 (-13% , $p = 0.02$) and day 21 (-9% , $p = 0.02$, Fig. 1a). One week after the surgery, we observed a significant difference in food intake between the sham and SG/pair-fed groups ($p < 0.0001$, Fig. 1b). Four weeks after surgery, epididymal white adipose tissue mass was decreased in the SG group compared to the sham (-22% , $p = 0.08$) and pair-fed groups (-32% , $p = 0.01$, Fig. 1c). An oral glucose tolerance test (oGTT) confirmed that glucose homeostasis was significantly improved 2 weeks after SG compared to the control groups ($p = 0.002$, Fig. 1d).

SG Does Not Alter Intestinal TTT or Fecal Water Content

We first assessed the effects of SG on intestinal function by measuring TTT and fecal water content from the three groups 2 weeks after surgery. As shown in Fig. 2a, b, there were no differences in these parameters among the three groups.

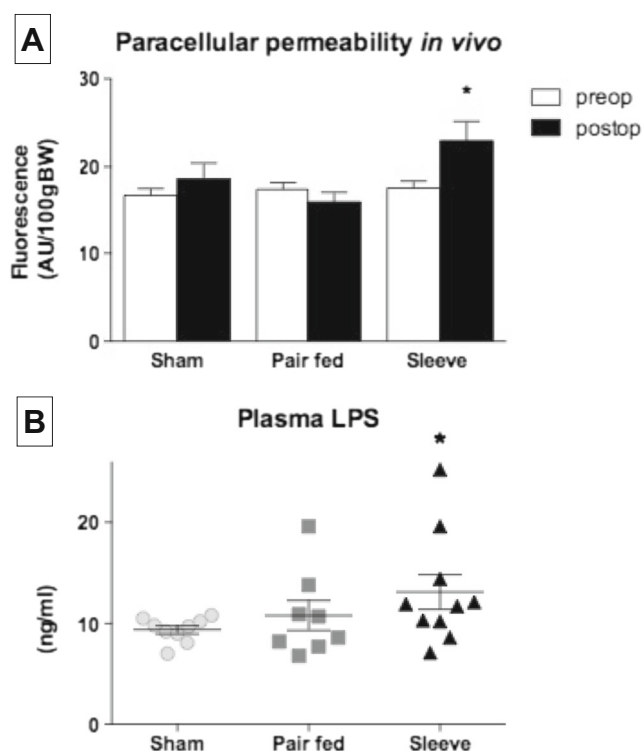


Fig. 5 In vivo measurement of the effect of sleeve on paracellular permeability (a). Consequences of sleeve on plasma lipopolysaccharides (LPS) 4 weeks after surgery (b). Data are means \pm SEM. * $p < 0.05$

SG Affects Differently Jejunal and Colon Permeabilities

SG decreased both paracellular permeability, as reflected by reduced F-SA transport (-39% , $p = 0.01$), and transcellular permeability, with reduced HRP flux (-45% , $p = 0.03$) measured ex vivo in jejunal biopsies (Fig. 3a, b). Consistently, these jejunal alterations were associated with higher mRNA expression of Jam A ($+31\%$, $p = 0.02$; Fig. 3c) and occludin ($+34\%$, $p = 0.01$; Fig. 3d) in the SG group, whereas ZO-1 mRNA levels were not significantly altered ($p = 0.27$; Fig. 3e). In contrast, both ex-vivo paracellular and transcellular permeabilities were respectively increased in the distal colon of SG mice ($+26\%$, $p = 0.07$ and $+44\%$, $p = 0.03$; Fig. 4a, b), whereas expressions of occludin, Jam A and ZO-1 mRNA were unchanged (Fig. 4c–e).

Effects of SG on In Vivo Paracellular Permeability, LPS Translocation, and Pro-inflammatory Markers Expression

We next measured the consequence of SG on in vivo paracellular permeability. While sham surgery has no effect on the paracellular transport of F-SA in plasma, SG increases significantly plasma F-SA concentrations 3 weeks after surgery (Fig. 5a). Thus, SG overall increases paracellular permeability, despite the reduced jejunal permeability observed ex vivo. Consistently, 4 weeks after surgery, plasma LPS levels were

significantly increased in the SG compared to the sham control mice ($+28\%$, $p = 0.03$) (Fig. 5b), suggesting that the increased colonic paracellular permeability favors LPS translocation. There were no modifications in the intestinal gene expression of pro-inflammatory cytokines (IL6, TNF α , and IFN γ) in the SG compared to the control group (*data not shown*). In contrast, in inguinal white adipose tissue, there was a significant increase in IL1 β mRNA levels in the SG compared to the sham group ($+30\%$, $p = 0.02$), with a trend for TNF α mRNA levels ($+33\%$, $p = 0.11$), whereas there was no change in IL1 β expression ($p = 0.35$) (Fig. 6a–c). As LPS also exerts some hepatic pro-inflammatory actions, we measured the expression of several hepatic acute-phase proteins. A significant increase in hepatic SAA2, SAA3, and haptoglobin mRNA levels was observed after SG (Fig. 6e, f, h). A trend for an increase in hepatic SAA4 mRNA levels was also noticed (Fig. 6g).

Discussion

Increased LPS translocation due to altered intestinal permeability has been suggested as a mechanism for the chronic inflammatory state and insulin resistance that are associated with morbid obesity. Using a mouse model, we investigated the effect of SG on intestinal permeability, LPS translocation and inflammation.

First, we observed a significant body weight reduction and a glucose homeostasis improvement, thereby validating our SG surgical model [21, 22]. Then, we more specifically examined intestinal function. Neither TTT nor fecal water content was significantly modified following SG. While it is known that gastric emptying is increased after SG, only one small study has shown a decrease in intestinal transit time 4 months after SG in humans [23].

For the first time, we showed that ex vivo jejunal intestinal permeability decreased 4 weeks after SG. The increased jejunal mRNA expression of tight junction proteins such as Jam A and occludin might have contributed to the reduced proximal intestinal permeability. One striking and novel finding is the fact that SG differentially affects intestinal permeability all along the gastrointestinal tract, with an increase ex vivo in the permeability of the colon after SG. It seems that the alteration of the colonic permeability plays a predominant role since there is an overall increase in vivo of the paracellular permeability 3 to 4 weeks after SG. In contrast to what was observed in the jejunum, no change was observed in the intestinal mRNA expression of tight junction proteins suggesting that alteration occurs at the protein level. Further studies are warranted to decipher the underlying mechanisms sustaining these permeability modifications. As the gut permeability in human could be different from laboratory rodents [24], it would be interesting to test the effect of SG in guinea pigs that share more similarities with humans [24]. One limitation of our study was the fact that the weight loss was less

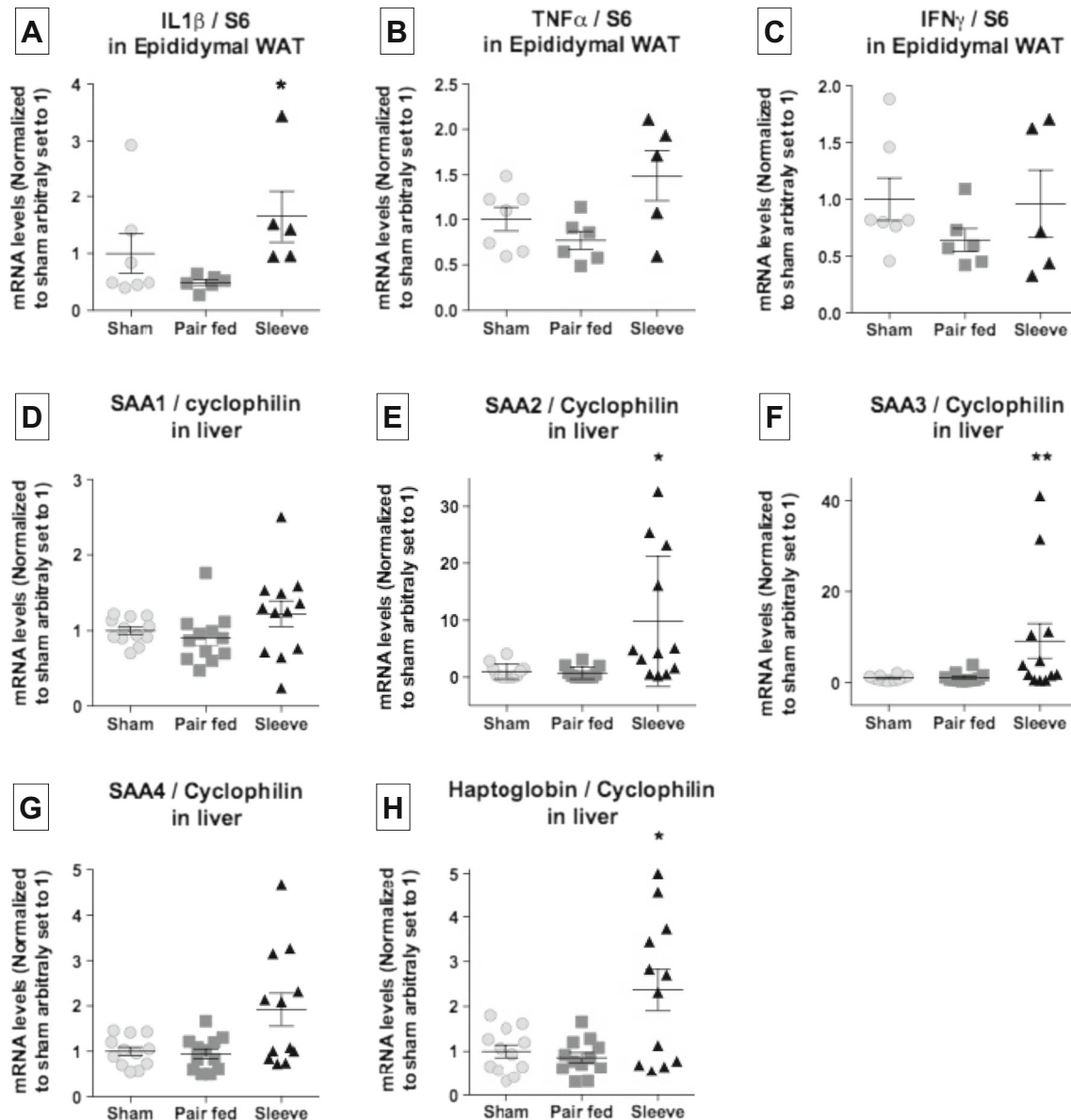


Fig. 6 Effect of sleeve on adipose (a–c) and hepatic gene expression (d–h). Values are normalized with S6 or cyclophilin and reported to values measured in the sham group arbitrarily set to 1. Data are means \pm SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

severe in the pair fed group than in the SG group. Indeed, we cannot rule out the possibility that an age- and body weight-matched group of mice would present similar gut permeability change than the SG group. To date, the effect of caloric restriction has been poorly explored. In 1992, one study showed that caloric restriction does not affect and prevent the aging induced increased intestinal permeability [25].

Few clinical studies have examined the impact of bariatric surgery on intestinal permeability. Based on the lactulose/mannitol ratio, it was reported that intestinal permeability was not modified 6 months after RYGB surgery in 16 obese patients [16]. In accordance with our mice data, one study performed 8 months after RYGB showed increased expression of tight

junction proteins and decreased paracellular permeability in the proximal intestine in humans [17].

In accordance with an increased in vivo permeability, plasma LPS levels were significantly increased in SG-operated compared to control mice. In contrast, it has been reported in humans that plasma LPS levels decrease rapidly after bariatric surgery, with a concomitant decrease of CRP levels [26, 27]. The reason for this discrepancy remains unclear and requires further investigation. Importantly, we found that this increase in plasma LPS following SG was associated with a pro-inflammatory state in inguinal adipose tissue and in the liver. Importantly, despite this low-grade inflammation, glucose homeostasis was improved after SG, suggesting that the other

beneficial metabolic effects of SG overcome the increased colonic permeability. If it is well admitted that bariatric surgeries induce a rapid glucose homeostasis improvement, the precise molecular mechanisms responsible for this beneficial effects are not fully characterized. Indeed, it was reported by several studies (reviewed in [28]) that reduced caloric intake, modification of gastro-intestinal peptides, alteration of bile acid fluxes, and microbiota changes can contribute to improvement in glucose homeostasis. Thus, it could be emphasized that the overall effect of SG on glucose homeostasis is the result of several positive and negative parameters and that the increased LPS influx by itself is not sufficient to alter glucose homeostasis.

Conclusion

SG induces significant modifications of intestinal paracellular and transcellular permeability. These changes potentially favor LPS translocation in plasma, thus promoting a low-grade pro-inflammatory state in adipose tissue and liver. However, they do not negate the beneficial effects of SG on glucose homeostasis. As a future work, it would be interesting to assess the long-term effect of SG on intestinal permeability and also the consequence of other bariatric procedures, i.e., RYGB.

Acknowledgements We thank Marie Liabeuf and Stephanie Lemarchand-Minde (Animal Facility, l'Institut du Thorax, Nantes, France) for their help in creating the animal care protocol. We thank the American Journal experts for the final editing of the manuscript.

Compliance with Ethical Standards All applicable institutional and/or national guidelines for the care and use of animals were followed.

Conflicts of Interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Source of Funding Région Pays de La Loire (France), CASDEN, Fondation Genavie.

References

- Sjöström L, Lindroos AK, Peltonen M, et al. Lifestyle, diabetes, and cardiovascular risk factors 10 years after bariatric surgery. *N Engl J Med*. 2008;351:2683–93.
- Wu Q, Zhang X, Zhong M, et al. Effects of bariatric surgery on Serum bile acid composition and conjugation in a diabetic rat model. *Obes Surg*. 2016;26:2384–92.
- Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes*. 2008;57:1470–81.
- Medzhitov R, Horng T. Transcriptional control of the inflammatory response. *Nat Rev Immunol*. 2009;9:692–703.
- De La Serre CB, Ellis CL, Lee J, et al. Propensity to high-fat diet-induced obesity in rats is associated with changes in the gut microbiota and gut inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2010;299:G440–8.
- Suzuki T, Hara H. Dietary fat and bile juice, but not obesity, are responsible for the increase in small intestinal permeability induced through the suppression of tight junction protein expression in LETO and OLETF rats. *Nutr Metab (Lond)*. 2010;7:19.
- Saad MJ, Santos A, Prada PO. Linking gut Microbiota and inflammation to obesity and insulin resistance. *Physiology (Bethesda)*. 2016;31:283–93.
- Trøseid M, Nestvold TK, Rudi K, et al. Plasma lipopolysaccharide is closely associated with glycemic control and abdominal obesity: evidence from bariatric surgery. *Diabetes Care*. 2013;36:3627–32.
- Caricilli AM, Picardi PK, de Abreu LL, et al. Gut microbiota is a key modulator of insulin resistance in TLR 2 knockout mice. *PLoS Biol*. 2011;9:e1001212.
- Burcelin R, Garidou L, Pomié C. Immuno-microbiota cross and talk: the new paradigm of metabolic diseases. *Semin Immunol*. 2012;24:67–74.
- Genser L, Poitou C, Brot-Laroche E, et al. Alteration of intestinal permeability: the missing link between gut microbiota modifications and inflammation in obesity? *Med Sci (Paris)*. 2016;32:461–9.
- Gummesson A, Carlsson LM, Storrlien LH, et al. Intestinal permeability is associated with visceral adiposity in healthy women. *Obesity (Silver Spring)*. 2011;19:2280–2.
- Brignardello J, Morales P, Diaz E, et al. Pilot study: alterations of intestinal microbiota in obese humans are not associated with colonic inflammation or disturbances of barrier function. *Aliment Pharmacol Ther*. 2010;32:1307–14.
- Teixeira TF, Souza NC, Chiarello PG, et al. Intestinal permeability parameters in obese patients are correlated with metabolic syndrome risk factors. *Clin Nutr*. 2012;31:735–40.
- Verdam FJ, Fuentes S, de Jonge C, et al. Human intestinal microbiota composition is associated with local and systemic inflammation in obesity. *Obesity (Silver Spring)*. 2013;21:E607–15.
- Savassi-Rocha AL, Diniz MT, Vilela EG, et al. Changes in intestinal permeability after roux-en-Y gastric bypass. *Obes Surg*. 2014;24:184–90.
- Casselbrant A, Elias E, Fändriks L, et al. Expression of tight-junction proteins in human proximal small intestinal mucosa before and after roux-en-Y gastric bypass surgery. *Surg Obes Relat Dis*. 2015;11:45–53.
- Yin DP, Gao Q, Ma LL, et al. Assessment of different bariatric surgeries in the treatment of obesity and insulin resistance in mice. *Ann Surg*. 2011;254:73–82.
- Tasselli M, Chaumette T, Paillusson S, et al. Effects of oral administration of rotenone on gastrointestinal functions in mice. *Neurogastroenterol Motil*. 2013;25:e183–93.
- Pais de Barros JP, Gautier T, Sali W, et al. Quantitative lipopolysaccharide analysis using HPLC/MS/MS and its combination with the limulus amoebocyte lysate assay. *J Lipid Res*. 2015;56:1363–9.
- Ryan KK, Tremaroli V, Clemmensen C, et al. FXR is a molecular target for the effects of vertical sleeve gastrectomy. *Nature*. 2014;509:183–8.
- Arapis K, Cavin JB, Gillard L, et al. Remodeling of the residual gastric mucosa after roux-en-y gastric bypass or vertical sleeve gastrectomy in diet-induced obese rats. *PLoS One*. 2015;10:e0121414.
- Melissas J, Leventi A, Klinaki I, et al. Alterations of global gastrointestinal motility after sleeve gastrectomy: a prospective study. *Ann Surg*. 2013;258:976–82.
- Delahunty T, Hollander D. A comparison of intestinal permeability between humans and three common laboratory animals. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol*. 1987;86:565–7.
- Ma TY, Hollander D, Dadufalza V, et al. Effect of aging and caloric restriction on intestinal permeability. *Exp Gerontol*. 1992;27:321–33.

26. Monte SV, Caruana JA, Ghanim H, et al. Reduction in endotoxemia, oxidative and inflammatory stress, and insulin resistance after roux-en-Y gastric bypass surgery in patients with morbid obesity and type 2 diabetes mellitus. *Surgery*. 2012;151:587–93.
27. Clemente-Postigo M, Roca-Rodriguez Mdel M, Camargo A, et al. Lipopolysaccharide and lipopolysaccharide-binding protein levels and their relationship to early metabolic improvement after bariatric surgery. *Surg Obes Relat Dis*. 2015;11:933–9.
28. Cho YM. A gut feeling to cure diabetes: potential mechanisms of diabetes remission after bariatric surgery. *Diabetes Metab J*. 2014;38:406–15.

Plasma cholesterol is excreted in the feces of patients with complete common bile duct obstruction

Ce projet, consistant à apporter la preuve que le TICE existe chez l'homme, a nécessité le recrutement de 2 patients. Afin de mesurer le cholestérol provenant du TICE, il est primordial de le séparer du cholestérol d'origine hépatobiliaire. Le recrutement de patients s'est donc focalisé sur des malades présentant un adénocarcinome du canal cholédoque provoquant une obstruction biliaire et nécessitant la pose d'un drain biliaire externe. Le protocole consiste à injecter un traceur stable du cholestérol (D7-cholestérol) et à récupérer, les 3 jours suivants, des échantillons de sang, de bile et de fèces. Une extraction lipidique est ensuite réalisée sur tous les échantillons afin de quantifier le cholestérol et le D7-cholestérol en GC-MS.

L'absence de bile dans les fèces des patients a été confirmée par Bili-IRM et par mesure des acides biliaires fécaux en GC-MS. Le dosage du traceur du cholestérol dans les fèces des patients montre l'apparition de D7-cholestérol à partir du 2ème ou du 3ème jour après injection, selon le patient. Ces résultats montrent que le TICE, après avoir été identifié chez la souris, existe également chez l'homme.

Plasma cholesterol is excreted in the feces of patients with complete common bile duct obstruction

Clinical relevance of TICE

François Moreau^{1*}, Claire Blanchard^{2*}, Christophe Perret³, Laurent Flet⁴, Frédéric Douane³, Eric Frampas³, Mikael Croyal⁵, Audrey Aguesse⁵, Michel Krempf⁵, Xavier Prieur¹, Matthieu Pichelin⁶, Bertrand Cariou* & Cédric Le May^{1*#}.

* contributed equally

Corresponding author: cedric.lemay@univ-nantes.fr

1. L'institut du Thorax, INSERM-CNRS, University of Nantes, Nantes, France.
2. Clinique de Chirurgie Digestive et Endocrinienne, CHU Hôtel Dieu, Nantes, France.
3. Radiology Department, Nantes University Hospital, Nantes, France.
4. CHU Nantes, Pôle Biologie Pharmacie, Service Pharmacie, Nantes, France.
5. INRA, UMR 1280, physiologie des adaptations nutritionnelles, 44000 Nantes, France.
6. L'Institut du Thorax, INSERM, CNRS, CHU Nantes, University of Nantes, Nantes, France.

Abstract

In mice, several studies have demonstrated the existence of an intestinal pathway of excretion of plasma derived cholesterol named Trans Intestinal Cholesterol Efflux (TICE). In humans, its clinical relevance *in vivo* has been challenged for years by the difficulty to discriminate plasma cholesterol excreted from biliary or transintestinal routes. Here, we assessed the fecal cholesterol excretion of intravenously injected D7-cholesterol in two patients presenting a total obstruction of their primary bile duct due to pancreatic neoplasms. Interestingly, we did observe a significant amount of D7-cholesterol in the feces of the two patients 48 and 72h after injection.

ClinicalTrials.gov Registration number: NCT01958216

Body text

Until very recently, it was admitted that the biliary pathway was the sole pathway involved in the fecal elimination of plasma cholesterol. In 2007 Albert K. Groen's team brought the first direct demonstration of a new pathway of excretion that was named TICE for Trans Intestinal Cholesterol Efflux (1). Although many molecular mechanisms are still misunderstood, several studies have contributed to a better understanding of this route (2)(3)(4). If in mice, TICE appears to be twice more efficient than the biliary pathway to eliminate plasma cholesterol, the relative importance and more importantly the clinical relevance of TICE remains a crucial but open question. Several indirect evidences have nonetheless suggested the existence of this pathway in man (5)(6). In 1959, Cheng and Stanley first described a intestinal cholesterol secretion in three patients presenting a total obstruction of the biliary and pancreatic ducts (5). In 1967, Simmonds *et al* observed by performing intestine perfusions in humans that 44% of the cholesterol found in the intestinal lumen derived from intestinal cells (6). The main criticism of these two interesting studies was the lack of evidence demonstrating the plasma origin of the cholesterol excreted in the intestinal lumen.

In 2013, we demonstrated *ex vivo* using the Ussing chambers that human intestinal jejunum can excrete cholesterol suggesting that TICE is an active pathway (3). The objective of the present study was to improve the seminal paper of Cheng and to demonstrate that patients with a defective

biliary pathway can excrete cholesterol from the plasma compartment in their feces and to bring the first *in vivo* clinical relevance of TICE in humans.

Results

The inclusion criteria were the following: Patients presenting a total obstruction of the intestinal biliary flow with a, external biliary derivation; older than 18 years old; with healthcare insurance are able to accept and validate the terms of the clinical trial. We excluded patients under 18 years old or adults under supervision, and those with inflammatory bowel disease, severe sepsis or cholangitis, primary intestinal cancer, liver or kidney failure, aphagia, acute or chronic diarrhea, or under pregnancy.

We were able to recruit two patients with neoplasia of the root biliary duct. The clinical characteristics of study subjects are listed in table 1. The total obstruction of the biliary pathway was first visualized by bile duct Magnetic Resonance Imaging (Figure 1 A). We next tried to detect by mass spectrometry the presence of Lithocholic Acid (LCA). We confirmed that LCA was undetectable in the feces of these two patients (data not shown). Similarly the use colorimetric enzymatic kit validated the absence of bile acids in the their feces (data not shown). Together these results confirmed the two patients present a defective biliary duct ruling out the possibility of a biliary delivery of plasma cholesterol in the gut.

After the set-up of the external biliary drainage, we harvested samples of blood, bile and feces prior the intravenous injection of one hundred milligrams of D7 cholesterol diluted in intralipid and 10 minutes, 24h, 48 and 72h after the injection.

Ten minutes after injection, we measured significant amount of D7 cholesterol in the plasma of both patients (Figure 1B) and observed a reduction of the D7 cholesterol plasma levels during the three following days validating the efficiency of plasma clearance pathways. Indeed, we measured a significant amount of D7 cholesterol in the bile collected via the external biliary cannula (Patient 1: 0,28 mg excreted during the first 24h, 0,29mg during the second 24h and 0,76mg during the last 24h; Patient 2: 0,38 mg excreted during the first 24h, 1,368 mg during the second 24h and 0,43 mg during the last 24h).

Interestingly, despite a total obstruction of the biliary route, we did observe a significant amount of D7 cholesterol in the feces of the two patients 48 and 72h after injection. Fecal D7 cholesterol was under the limit of detection in both patients the day after the plasma injection. In patient 1, we observed the appearance of the D7 cholesterol peak at day 2 (Figure 1C) and quantified 0,13 μ g of D7 cholesterol per gram of feces (Figure 1B). Patient 1 did not produce feces at day 3. We observed a similar pattern with patient 2, he did not produce feces at day 2 but we quantified 0,33 μ g of D7 cholesterol per gram of feces at day 3 (Figure 1B&C).

Discussion

These data constituted the first direct proof of concept that plasma cholesterol can be excreted in the feces of patients with a defective biliary route and thus that TICE is an active pathway in humans. By contrast with two previous studies (5)(6), the use of a cholesterol tracer (D7 cholesterol) allow us to follow the fecal elimination of cholesterol from the plasma compartment. Interestingly, Groen's team recently published a kinetic study performed in humans and showed that TICE contributes to 30-35% of the cholesterol excreted in the feces and can be strongly unregulated with Ezetimibe (7).

Despite its novelty, our study suffers from several limitations. First, for practical and logistical reasons but also because of the precarious health of the patients, we did not succeed to harvest the full feces production in both patients during the three days after injection. This would have been very precious to calculate the relative importance of the biliary versus the transintestinal routes in plasma cholesterol elimination and to compare it with previous data (7). Plasma cholesterol can be excreted by the small intestine by two independent pathways. An active pathway named TICE that is fast and required several transporters (reviewed in (8)). The rapid turnover of the epithelial intestinal cells can also contribute to a part of the clearance of the plasma D7 cholesterol. This phenomenon named shedding is difficult to quantify without intrusive methods that cannot be used in humans. In mouse models under unstimulated conditions, shedding cells contribute maximally to

30% of the cholesterol excreted in the feces (2). We cannot discard the possibility that a part of the D7 cholesterol found in the feces originates from desquamated cells.

Biliary and transintestinal routes are two routes that exist independently but TICE is strongly stimulated by cholesterol acceptors provided by the bile such as phospholipids and bile acids (1)(9). In 2007, Van der Velde et al reported that intestinal cholesterol excretion can occur in absence of bile salts if luminal phospholipids are available. We emphasized that in the two patients measured, the intestinal flow of D7 cholesterol excreted is far from maximal and probably made possible by the luminal phospholipids provided by the diet.

In summary, our data bring the proof of concept that TICE is an active pathway in humans and suggest that a better understanding of the molecular mechanisms behind this efflux could open new therapeutical options for patients at risk of cardiovascular diseases.

Legends

Table 1: Clinical Characteristics of Study Subjects

Figure 1: A) Assessment of the biliary pathway obstruction by bile duct Magnetic Resonance Imaging in both patient; B) Measurement of D7-cholesterol in plasma, bile and feces. C) GC-MS Ion chromatograms of the fragment ion at m/z 465 obtained in SIM mode.

References:

1. Van der Velde, A. E., Vrans, C. L., Van den Oever, K., Kunne, C., Elferink, R. P. O., Kuipers, F., & Groen, A. K. (2007). Direct intestinal cholesterol secretion contributes significantly to total fecal neutral sterol excretion in mice. *Gastroenterology*, *133*(3), 967-975.
2. van der Veen, J. N., van Dijk, T. H., Vrans, C. L., van Meer, H., Havinga, R., Bijsterveld, K., ... & Kuipers, F. (2009). Activation of the liver X receptor stimulates trans-intestinal excretion of plasma cholesterol. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(29), 19211-19219.
3. Le May, C., Berger, J. M., Lespine, A., Pillot, B., Prieur, X., Letessier, E., ... & Costet, P. (2013). Transintestinal cholesterol excretion is an active metabolic process modulated by PCSK9 and statin involving ABCB1. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, *33*(7), 1484-1493.
4. van der Velde, A. E., Vrans, C. L., van den Oever, K., Seemann, I., Elferink, R. P. O., van Eck, M., ... & Groen, A. K. (2008). Regulation of direct transintestinal cholesterol excretion in mice. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, *295*(1), G203-G208.

5. Cheng, S. H., & Stanley, M. M. (1959). Secretion of Cholesterol by Intestinal Mucosa in Patients with Complete Common Bile Duct Obstruction.*. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 101(2), 223-225.
6. Simmonds, W. J., Hofmann, A. F., & Theodor, E. (1967). Absorption of cholesterol from a micellar solution: intestinal perfusion studies in man. *Journal of Clinical Investigation*, 46(5), 874.
7. Jakulj, L., van Dijk, T. H., de Boer, J. F., Kootte, R. S., Schonewille, M., Paalvast, Y., ... & Beuers, U. H. (2016). Transintestinal cholesterol transport is active in mice and humans and controls ezetimibe-induced fecal neutral sterol excretion. *Cell metabolism*, 24(6), 783-794.
8. Blanchard, C., Moreau, F., Cariou, B., & Le May, C. (2014). Trans-intestinal cholesterol excretion (TICE): A new route for cholesterol excretion. *Medecine sciences: M/S*, 30(10), 896-901.
9. van der Velde, A. E., Vrins, C. L., van den Oever, K., Seemann, I., Elferink, R. P. O., van Eck, M., ... & Groen, A. K. (2008). Regulation of direct transintestinal cholesterol excretion in mice. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 295(1), G203-G208.

Correspondence:

Address requests for reprints to: Cedric Le May, PhD, l'institut du thorax, INSERM, CNRS, UNIV Nantes, Nantes, France. e-mail: cedric.lemay@univ-nantes.fr

Conflicts of interest

These authors disclose no conflicts.

Materials & Methods

See Supplementary Materials & Methods.

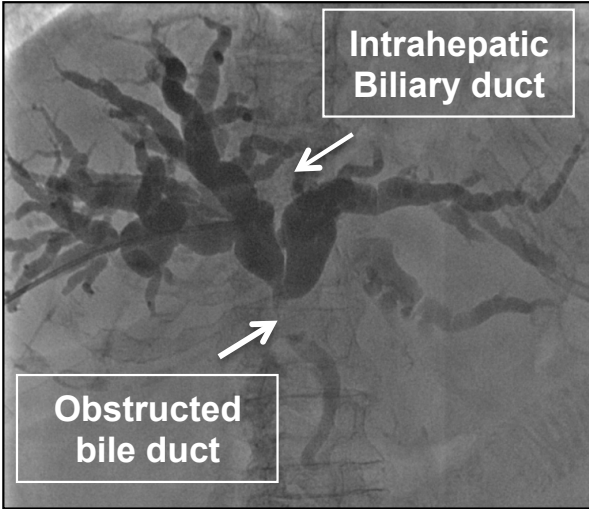
Abbreviations used in this paper: MRI, Magnetic Resonance Imaging; ND, Non-detectable; TICE, Trans Intestinal Cholesterol Efflux

Clinical Characteristics of Study Subjects

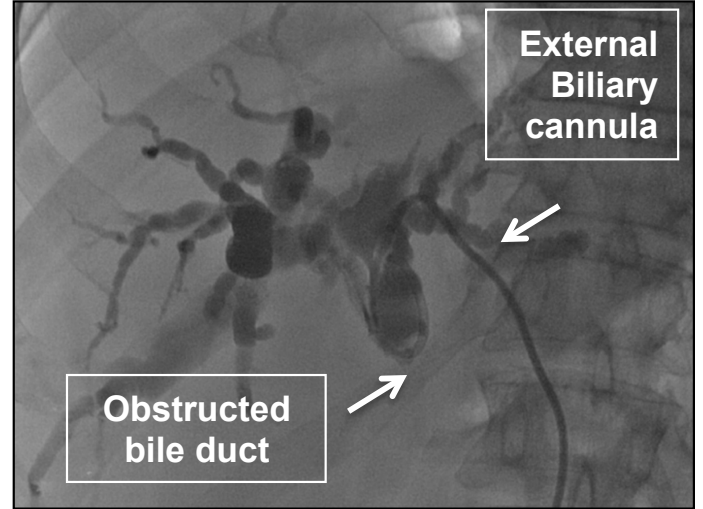
	Patient 1	Patient 2
Age	84	66
Gender	Female	Male
Body Weight (kg)	62,4	69
Hemoglobine (g/dL)	10,9	11,9
Red blood cells (Tera/L)	3,67	3,71
Leukocyte (Giga/L)	12,9	8,96
Platelets (Giga/L)	333	267
AST (μkat/L)	1,37	1,23
ALT (μkat/L)	1,43	1,26
GGT (μkat/L)	0,61	9,17
PAL (μkat/L)	2,33	4,91
Albumin (g/L)	25,1	31
Creatinine (μM)	70	62
Bilirubine (μM)	346	367
Conjugated Bilirubine (μM)	283	327
Glucose (mM)	5,4	4,7
Total Cholesterol (g/L)	3,95	4,51
HDL Cholesterol (g/L)	0,08	0,08
Triglyceride (g/L)	3,45	3,43

A

Patient 1



Patient 2



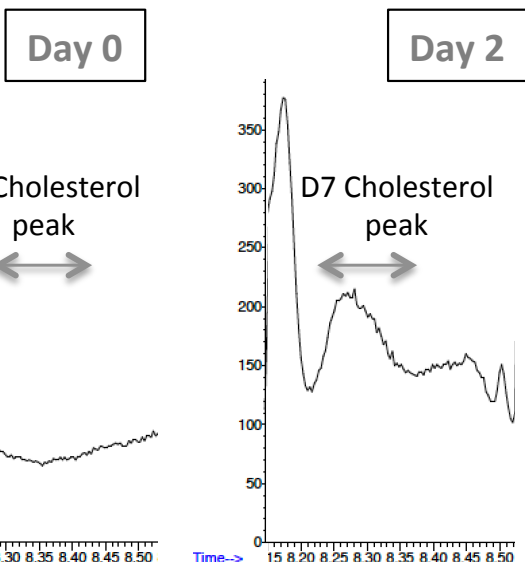
B

		Prior Injection	+ 10 minutes	+24h	+48h	+72h	
Plasma	Patient 1	0	7,67	6,12	6,43	4,88	ug/ml
	Patient 2	0	15,04	12,35	11,63	8,81	
Bile	Patient 1	0	-	1,28	2,48	2,54	ug/g feces
	Patient 2	0	-	0,38	0,76	0,27	
Feces	Patient 1	0	-	ND	0,13	No feces	ug/g feces
	Patient 2	0	-	ND	No feces	0,33	

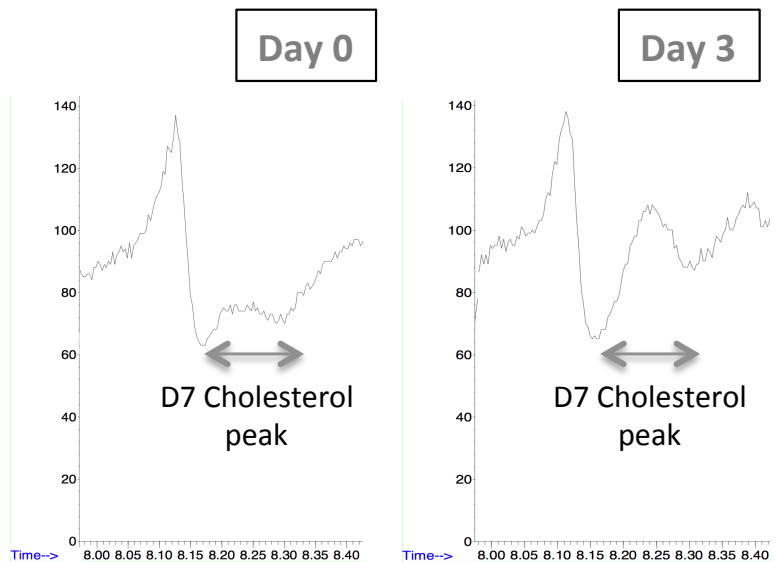
	Bile volume (ml)	0-24h	24-48h	48-72h
<i>Patient 1</i>		220	120	300
<i>Patient 2</i>		1000	1800	1600

C

Patient 1



Patient 2



Protocol TICE in human

Fecal sterol measurement by GC-MS

Following D7-cholesterol injection, feces were daily collected, freeze dried, weight and ground. Twenty milligrams or 50 mg of feces were weighed for respectively cholesterol and D7-cholesterol quantification. Then, each fecal sample was resuspended in 500 μ l of distilled H₂O and 500 μ l of 90% ethanol, after adding internal standard (5 α -cholestane). Liquid extraction was realized by adding 3 ml of chloroform/methanol (2:1) and centrifuge at 2000 rpm during 5 minutes at 15°C. Inferior phase, containing the lipids, was collected and dry under N₂ at 60°C. To measure total cholesterol, the sample was saponified by adding 500 μ l of 90% ethanol and 250 μ l of 1N NaOH. A double extraction was then realized with respectively 3 and 1 ml of cyclohexane. The upper phase was collected and dry under N₂ at 60°C. Finally, sample was derivatized by silylation with N-Methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (MSTFA) at 70° for 40 min. Sample was dry under N₂ at 60°C and resuspended in 4ml of cyclohexane. Cholesterol, D7-cholesterol and internal standard were measured in these extract by GC-MS

Plasma and bile sterol measurement by GC-MS

Plasma and bile sterol extraction was performed from 20 μ l sample of plasma and bile. Internal standard was added before liquid extraction with 200 μ l of cyclohexane/isopropanol (3:2). After centrifugation at 10 000rpm for 10 min at 15°C, superior phase, containing the lipids, was collected and dry under N₂ at 60°C. To measure total cholesterol, the sample was saponified by adding 200 μ l of 90% ethanol and 100 μ l of 1N NaOH. A double extraction was then realized with respectively 1,5 and 1 ml of cyclohexane. The upper phase was collected and dry under N₂ at 60°C. Finally, sample was derivatized by silylation with N-Methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (MSTFA) at 70° for 40 min. Sample was dry under N₂ at 60°C and resuspended in 250 μ l of cyclohexane. Cholesterol, D7-cholesterol and internal standard were measured in these extract by GC-MS.

Fecal biliary acids measurement by GC-MS

Biliary acid extraction was performed from a 50 mg sample of lyophilized feces. Hyodeoxycholic acid was used as an internal standard and added in each sample prior deconjugation with 1 ml of alcoholic NaOH 1N. After an 1 hour incubation at 67 °C, 500 μ l of distilled water was added in each samples. Neutral sterol were extracted by addition of 2,5 ml of cyclohexane. The upper phase containing neutral sterol was, then, discarded. Hydrolyze of bile acid ester was realized with 200 μ l of NaOH 10N and a 3 hours incubation at 110 °C. Prior biliary acid extraction, 500 μ l of distilled water was adding and sample was acidified with 300 μ l of HCL 37,5% to lower the pH to 1,5. Then, 1,5 ml of diethyl ether was added and the upper phase collected. Finally, sample was derivatized with 200 μ l of HCL 1,25 M at room temperature (RT) for 1 hour and then dry under N₂ at 60 °C. A second derivation was performed with N-Methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (MSTFA) at 70° for 40 min. Sample was dry under N₂ at 60 °C and resuspended in 200 μ l of cyclohexane. Alpha, beta and omega murocholic, deoxycholic, chenodeoxycholic, hyodeoxycholic, ursodeoxycholic, cholic and lithocholic acid were measured in these extract by GC-MS.

Analytical conditions

All the measure realized by GC-MS were performed on an Agilent 7890 GC system associated with a 5975 MS detector. The GC was fitted with a HP-1MS capillary column (30,0m x 0,25mm x 0,25 μ m; Agilent 19091S-933). A 2 μ l sample was injected in split less mode. Injection temperature was set at 250°C and helium was used as carrier gas at 42cm/second in constant linear velocity. For sterol detection, GC oven was programmed as follows: 150°C-(hold 2 min)-(50°C/min)-290°C-(10°C/min)-320-(Hold time 2 min). For biliary acids detection, GC oven was programmed as follows: 150°C-(hold 2 min)-(40°C/min)-270°C-(0,5°C/min)-280. Electronic ionisation was realized at 70 eV. MS-quadrupole and MS source were set at 150°C and 230°C respectively. Methods were designed in a full scan mode (m/z: 50-600) and sim mode was used for quantification. For sterol quantification, m/z 372, 301 and 465 were selected to measure 5 alpha-cholestane, cholesterol and D7-cholesterol respectively. For biliary acids measurements, m/z 195 was used to measure alpha/beta and omega murocholic, m/z=370 for DCA, CDCA and HDCA, m/z=460 for UDCA, m/z=368 for CA and m/z=372 for LCA. Solvent delay was set at 5 min for cholesterol measurement and 15 min for biliary acid. All GC-MS data were analyzed with Enhanced chemstation MSD chemstation E02011177 agilent technologies INC.

PCSK9 is not secreted by mature differentiated intestinal cells

L'hypercholestérolémie est un des risques majeurs de maladies cardiovasculaires. Découverte en 2003, la pro-protéine convertase subtilisine/kexine de type 9 (PCSK9), inhibiteur naturel du récepteur aux LDL (LDLr), constitue un régulateur clef du métabolisme du cholestérol. PCSK9 est fortement exprimée dans le foie mais également dans l'intestin. Le développement d'une souris ayant une déficience hépatique de PCSK9 a montré que l'action extra-hépatique de PCSK9 est responsable d'un tiers du phénotype d'hypocholestérolémie observé chez les souris totalement déficientes en PCSK9. L'objectif de ce projet consiste à mieux caractériser la forme intestinale de PCSK9 et en particulier à répondre à un débat concernant l'aptitude de l'intestin à sécréter ou non PCSK9.

Nous avons démontré, *in vivo* et *ex vivo*, que l'intestin ne participe pas aux niveaux circulants de PCSK9. Nous avons ensuite démontré qu'en dépit d'une expression intracellulaire importante les entérocytes matures ne sécrètent pas PCSK9. En effet, les cellules humaines Caco-2 sécrètent PCSK9 aux stades précoces de différenciation mais perdent cette capacité après 16 jours de culture. Le contenu intracellulaire est également réduit pendant la maturation entérocytaire. Le clivage et l'export de PCSK9 vers le golgi ne sont pas altérés contrairement à la sécrétion post golgi de PCSK9 qui semble non fonctionnelle dans les entérocytes matures. L'analyse des modifications post traductionnelles de PCSK9 suggère l'existence d'une modification de l'état de glycosylation de PCSK9 entre les jours 8 et 16. Nos travaux montrent ainsi que la perte, par les entérocytes matures, de leur capacité à sécréter PCSK9 est due à une réduction de sa demie vie et à une altération de la sécrétion post golgienne de PCSK9.

PCSK9 is not secreted by mature differentiated intestinal cells

François Moreau,¹ Damien Garçon,¹ Gilianne Chadeuf,¹
Laurianne Van Landeghem,² Melissa Touvron,² Claire Blanchard,³
Audrey Ayer,¹ Karim Si-Tayeb,¹ Xavier Prieur,¹ Nabil Seidah,⁴
Annik Prat,⁴ Michel Neunlist,⁵ Bertrand Cariou⁶ Cedric Le May^{1*}

¹INSERM, UMR 1087, CNRS UMR 6291, Nantes, F-44000 France

²Department of Molecular Biomedical Sciences, College of Veterinary Medicine,
North Carolina State University, Raleigh, NC, USA

³Clinique de Chirurgie Digestive et Endocrinienne, University Hospital of Nantes, France

⁴Institut de Recherches Cliniques de Montral, Montreal (QC), Canada

⁵CHU Nantes, Institut des Maladies de l'Appareil Digestif, Nantes, France

⁶Department of Endocrinology, University Hospital of Nantes, France

*To whom correspondence should be addressed; E-mail: cedric.lemay@univ-nantes.fr.

Proprotein Convertase Subtilisin Kexin of type 9 (PCSK9) promotes LDL receptor lysosomal degradation and is a key regulator of cholesterol metabolism. Beyond the liver, the small intestine is the second organ to highly express PCSK9 but its capability to secrete it remains matter to debate. We confirm, in vivo, the inability of the small intestine to contribute to circulating PCSK9. Interestingly, PCSK9 is highly secreted by non mature Caco-2 cells and no longer by mature enterocyte. Our work shows that mature enterocyte lose their ability to secrete PCSK9. Mechanisms behind this loss are still under investigation but involve at least a PCSK9 half-life decrease and a modification of glycosylation altering, probably, the post-golgi processing of PCSK9.

Introduction

Proprotein Convertase Subtilisin Kexin of Type 9 (PCSK9) promotes the lysosomal degradation of the Low Density Lipoprotein Receptor (LDLR). Numerous genetic (1), clinical (2) or interventional studies (3) have demonstrated that inhibiting PCSK9 efficiently reduces plasma LDL cholesterol and thus could represent a new safe approach to reduce cardiovascular diseases. Monoclonal PCSK9 antibody-based therapies have been recently approved in several countries but there is still much to be learned about PCSK9 biology, notably its role beyond the liver. Indeed, Only few studies have explored extra-hepatic functions for PCSK9 (reviewed in (4)). The development of a mouse with a specific deletion of PCSK9 in the liver (liver PCSK9^{-/-}) indicated that the liver is responsible for two-thirds of the hypocholesterolemic phenotype of full PCSK9^{-/-} mice, demonstrating that PCSK9 controls cholesterol homeostasis through extra-hepatic pathways (5). PCSK9 is mainly expressed in the liver but also at high level in the small intestine and kidneys (6). The small intestine is an organ that plays a crucial role in cholesterol homeostasis by regulating dietary lipid absorption, chylomicrons secretion, bile acid reabsorp-

tion, HDL production as well as the Trans-Intestinal Cholesterol Excretion (TICE) pathway (reviewed in (7)). It was previously reported that PCSK9 deficiency increases the intestinal LDLR protein content (8) and that intravenous injection of recombinant PCSK9 reduces intestinal LDLR protein content (9) demonstrating that PCSK9 induced intestinal LDLR degradation is functional.

We were the first to show that PCSK9 deficiency significantly affects postprandial lipemia, intestinal apolipoprotein B secretion and TICE (10, 11). However, it is still unclear whether these defects are due to the absence of circulating PCSK9 produced by the liver or directly to intestinal PCSK9 deficiency. In addition, PCSK9 was not detectable in plasma of liver PCSK9 KO (5) suggesting that circulating PCSK9 has a hepatic origin. This finding suggests that PCSK9 acts autocrinally, paracrinally or intracellularly in extrahepatic organs. These latest results were recently challenged by a study showing that differentiated human enterocytic Caco-2 cells are able to secrete PCSK9 in the basolateral media (12).

Materials

Materials Human D374Y- R218L PCSK9 recombinant protein was a gift from Robert Day (University of Sherbrooke, Canada).

Human biopsies The human tissue fragments were processed according to the French Guidelines for Research on Human Tissues (ref: Recommendations for cryopreservation of cells tumor tissues to be used for molecular analyses]. *Ann Pathol.* 2001;21:184-201.). Informed patient consent was obtained, according to the French bioethics law (Ref: French Bioethic Law No. 2004-800. 2008). A detailed protocol and information concerning patients are available in the supplemental materials.

Animals C57BL6/J mice were purchased from Charles River Laboratories (France). LDLR^{-/-} mice were purchased from Jackson Laboratories (Maine, USA). Experiments on liver PCSK9 deficient mice were performed in Nabil Seidahs laboratory (IRCM, Montreal, Canada). Mice had free access to food and water under a 12-hour light/12-hour dark cycle in a temperature-controlled environment. All animal studies were conducted with age-matched male mice (2-month-old), and approved by the Unit de Therapie Experimentale (Agreement No. BP44015). Sox9-EGFP reporter mice express a BAC transgene with 226.5kb of Sox9 genomic regulatory region driving EGFP expression. Mice were maintained as heterozygotes by breeding with wild type CD-1 strain mice as previously described (13, 14). All animal studies were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) of North Carolina State University (Raleigh, NC).

Circulating PCSK9 measurement in different biological compartments of mice After 14h of fasting, mice received an olive oil gavage. All mice were anesthetized with a mix of ketamine/xylazine (90/10 mg/Kg BW IP) one hour post gavage. Systemic blood was harvested from mice tail or cheek. A laparotomy was performed and bile was diverted and collected by gravimetry. Small intestine was perfused as described by Le May et al (11). Portal blood, urine and lymph were harvested from portal vein, bladder and mesenteric lymph respectively. PCSK9 measurements were realized by ELISA.

Isolation and culture of the four Sox9-EGFP cell populations Isolation and culture of the four Sox9-EGFP cell populations (Sox9-EGFP Negative, Sox9-EGFP Sublow, Sox9-EGFP Low and Sox9-EGFP High cells) were carried out following methods described in Van Landeghem et al., 2012. Briefly, jejunum of 6-10 week old Sox9-EGFP mice were flushed with ice cold 1X PBS, cut open longitudinally, and placed in 30mM EDTA/1.5mM DTT/ PBS over ice for 15 minutes, and then incubated in 30mM EDTA/PBS at 37C for 8 minutes. Jejunal

tissue was shaken vigorously and intact tissue was discarded. Remaining cells were washed with 1X PBS and incubated in 0.3U/ml dispase (Corning, NY)/ Hanks buffered saline solution (HBSS) at 37C. Samples were shaken vigorously every 2 minutes for 10 minutes, and fetal bovine serum (FBS, 10% v/v) (Gemini, West Sacramento, CA) and 100g/ml DNase I (Roche, Basel, Switzerland) were subsequently added. Prior to FACS, dissociated cells were sequentially passed through 100m, 70m, and 40m filters. The cells were pelleted and placed in Advanced DMEM F12 (Life Technologies, Carlsbad, CA)/ 10% FBS/ 100g DNaseI/10M Y27632 (Sigma, St. Louis, MO). Sorting of Sox9-EGFP High, Low, Sublow and Negative cells was performed using a Sony SH800 cell sorter and software (Sony Biotechnology Inc., San Jose, CA). Dead and immune cells were excluded using forward-side scatter gating, and doublets were discriminated using forward scatter and back scatter height-width plots. Gating strategy was identical to previous studies (14, 15). Sorted Sox9-EGFP cells (Sox9-EGFP Negative, Sox9-EGFP Sublow, Sox9-EGFP Low and Sox9-EGFP High cells) were resuspended at a density of 20,000 cells/50l/well (24-well plate) in hESC-qualified Matrigel (Corning) supplemented with 1M Jagged-1 peptide (AnaSpec, San Jose, CA), 50ng/ml mEGF (R&D, Minneapolis, MN), 100ng/ml Noggin (Peprotech, Rocky Hill, NJ), and 1g/ml R-Spondin 1 (R&D). After total polymerization, droplets were overlaid with 500l Advanced DMEM/F12 containing N2 supplement (Life Technologies), B27 supplement minus vitamin A (Life Technologies), 10mM HEPES (Life Technologies), 50IU/ml penicillin (Gemini), 50g/ml streptomycin (Gemini), 2mM L-glutamine (Corning), 1M Jagged-1 peptide, 50ng/ml mEGF, 100ng/ml Noggin, 1g/ml R-Spondin 1 and 10M Y27632. Twenty-four hours post-plating, supernatants were collected, centrifuged for 5 minutes at 3,500rpm to eliminate potential cells or debris, and snap-frozen in liquid nitrogen.

PCSK9 gene expression in the four Sox9-EGFP cell populations PCSK9 gene expression levels in the four Sox9-EGFP cell populations (Sox9-EGFP Negative, Sox9-EGFP Sublow, Sox9-EGFP Low and Sox9-EGFP High cells) were extracted from the microarray dataset deposited in the NCBI GEO database under the accession number GSE32227 and normalized as described in previous study (14).

PCSK9 secretion measurement in Ussing chambers Explants of duodenum, jejunum, ileon and colon from C57BL6/J and LDLR^{-/-} mice and colon from human were fixed on slides (P2407 - physiologic instruments) and placed in Ussing chambers (P2400 - physiologic instruments). Tissues were incubate at 37C in an oxygenated Krebs solution (NaCl 115 mM; NaHCO₃ 25 mM; K₂HPO₄ 2,4 mM; MgCl₂ 1,2 mM; CaCl₂ 1,2 mM; KH₂PO₄ 0,4 mM) supplemented with 10 mmol/L glucose in the basolateral media or 10mM Mannitol in the apical media. After 2 hours incubation basolateral media and the tissues were collected to estimate PCSK9 amount by ELISA.

Real time quantitative PCR Total RNA from tissues or cell samples were purified with the Nucleospin RNA II (Macherey Nagel, Hoerd, France). Total RNA was reverse-transcribed and real-time quantitative PCR was performed using the Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System. Real time PCR analyses were performed with the MESA Green qPCR MasterMix plus (Eurogentec, Angers, France). For real time PCR oligonucleotide sequences, please see Supplemental Table. Values are normalized to cyclophilin.

Cell culture Caco-2 cells were cultured in T-75 flasks (Corning Glassworks, Corning, NY) in DMEM (Lonza, Levallois-Perret, France) with 4.5 g/l glucose and supplemented with 10% FBS (Biowest, Nuail, France), 2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin, and 100 mg/ml streptomycin. Once the flasks reached 80% confluence, the cells were split and seeded at a density of 0.2 X

105 cells/well onto polycarbonate micropore membranes (0.4 mm pore size, 24 mm diameter) inserted into Transwells (Costar, Cambridge, MA). Cells were fed every two day. Before each experiment, the integrity of the cell monolayer was checked by measuring transepithelial electrical resistance with a voltmeter equipped with a chopstick electrode (Millicell ERS; Millipore, Saint Quentin enYvelines, France).

PCSK9 stability measurement PCSK9 stability was measure on Caco-2 cells 8 and 16 days after seeding. This measure was done in the presence or absence of 100M chloroquine and 10 μ M of leupeptine. Protein secretion was inhibited with 5 microgramme/ml of brefeldin A one hour before the measure. Cycloheximide (5 microgramme/ml) was added in both apical and basolateral media in order to block protein synthesis. Cells and media were collected a different time following the addition of cycloheximide. Proteins were extract from the cells and 50 microgramme were resolved on NuPage 4-12% BisTris gels in MES SDS buffer (Invitrogen) under reducing conditions for western blot analysis. Immunoblots were realized with a polyclonal sheep antibody (R&D; AF3888).

Analysis of glycosylation Twenty microgram of a crude cell lysat were heat denatured in a glycoprotein denaturing buffer (NEB) at 100C for 10 min. Sample were then incubated over night at 37C in the presence or absence of 1000 U of PNGase F (NEB; P0708L), 300 U of PNGase FII (Immune Technology; IT-000-PNGF2) or 2500 U of endo H (NEB; P0702L). Samples were resolved on NuPage 8% BisTris gels in MES SDS buffer (Invitrogen) under reducing conditions for western blot analysis. Immunoblots were realized with a polyclonal sheep antibody (R&D; AF3888).

Western Blots Caco-2 cells lysates and mice scraped intestinal mucosa were homogenized, and 75 microgramme of total lysate proteins were resolved on NuPAGE 412% BisTris gels in

MES SDS buffer (Invitrogen) under reducing conditions for western blot analysis, as described elsewhere. For 2 dimensional SDS page, whole cell lysates were separated by a first horizontal dimension using a wide pH range isoelectrofocusing gel strip (pH 611) and then vertically by SDS-PAGE (4-12%). After SDS-PAGE, the proteins were electrotransferred onto a nitrocellulose membrane. We used antibodies raised against PCSK9 (R&D Systems, Lille, France) and Actin (Santa cruz biotechnology, Dallas, USA). Immunoreactive bands were revealed using the ECL plus kit (Amersham Biosciences).

PCSK9 ELISA measurement PCSK9 was measured using commercial mouse / human ELISA kit (Circulex CY-8078 & CY8079, Clinisciences, France).

Statistics All results are reported as means \pm SEM. Statistical significance was analyzed using a non-parametric Mann-Whitney test. The values of $p < 0.05$ were considered as significant.

Results

In vivo, the small intestine does not contribute to circulating PCSK9

We first verify whether the gut can release intestinal PCSK9 in the plasma compartment. To do so, we harvest blood in two biological compartments used for intestinal secretion i.e. the mesenteric lymph and the blood from portal vein in mice under postprandial state. As shown in Figure 1A, we did not measure significant difference in PCSK9 concentration in portal vein blood, mesenteric lymph and tail vein blood. As control, we were unable to detect PCSK9 in intestinal lumen, bile or urine (Figure 1A). We next compare PCSK9 levels from portal or cheek vein blood in WT or liver PCSK9 deficient (*L-pcsk9^{-/-}*) males and females. Plasma PCSK9 levels were similar between systemic or portal compartments both in WT males and females (Figure 1B). We noticed as before (16) (17) that circulating PCSK9 is significantly higher in

females than males (Figure 1B). Consistently with Zaid's study (5), PCSK9 was not detected by ELISA in systemic or portal vein blood from L-*pcsk9*^{-/-} males and females (Figure 1B). Together, these data confirmed that the small intestine does not significantly affect circulating PCSK9.

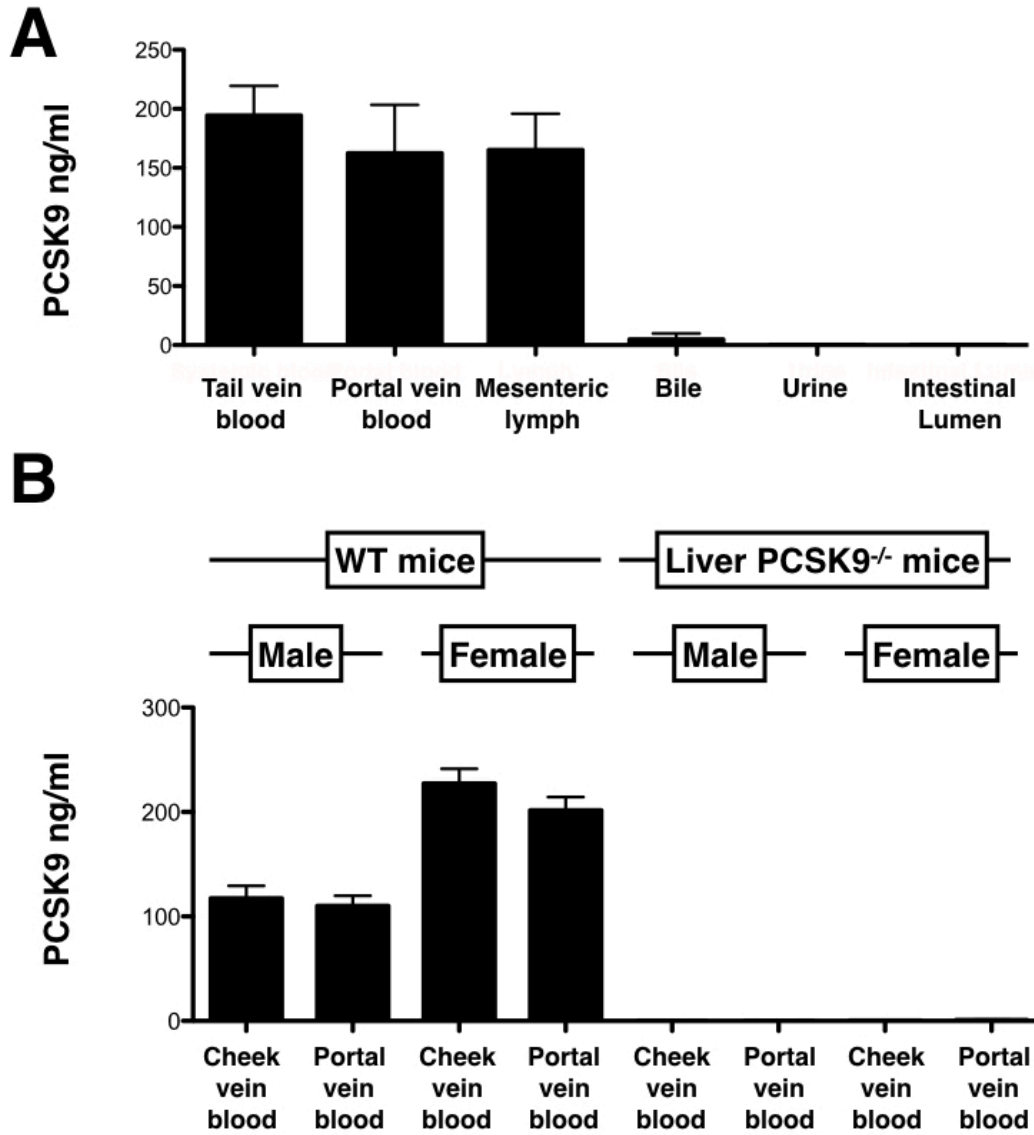


figure 1. Comparison of circulating PCSK9 in several biological compartments. PCSK9 amount was measured by ELISA from 50 μ l of plasma collected in portal vein blood and in tale blood or cheek vein blood. **(A)** All these measure were realised in WT female mice and as a negative control, same measure were realised in bile, urine and lymph. **(B)** Same measurement were repeated in WT and liver KO male and female mice. Histograms represents means \pm SEM.

The small intestine does not locally secrete PCSK9 ex vivo

We next assess the ability of enterocyte to secrete PCSK9 locally via autocrine or paracrine mechanisms. Intestinal biopsies (proximal, medial, distal intestine or colon) from WT, LDL receptor deficient mice (LDLR^{-/-}) or human colon were harvested and mounted on Ussing chambers. Intestinal explants were maintained for two hours in iso-osmotic buffer. After the period of incubation, the intestinal PCSK9 content and PCSK9 released in basolateral media under non stimulated conditions were quantified by ELISA. Despite presence of intracellular PCSK9 (Data not shown), we were unable to detect murine or human PCSK9 in the basolateral media. To rule out the possibility that the ELISA is not sensitive enough, we perform acetone precipitation and western blotting of protein released in the basolateral media. Even after protein precipitation, no band corresponding to PCSK9 appear (Data not shown).

PCSK9 secretion is dramatically reduced in highly differentiated human Caco-2 cells

To test the ability of Caco-2 cells to secrete PCSK9 we cultivate them onto polycarbonate micropore membranes inserted into Transwells. Each 2 days, cells were collected to measure PCSK9 gene expression by qPCR. We confirm that PCSK9 is expressed by Caco-2 cells and in a relatively stable manner during enterocyte maturation (figure 2A). In contrast, all the genes marker of mature enterocyte were increased following the differentiation (figure 2A). PCSK9 content in basolateral media was asses by ELISA. It was previously reported that Caco-2 cells secrete PCSK9 (12). We confirm this data by measuring the 2 hours secretion of PCSK9 in the basolateral media (figure 2C). Interestingly, we show that PCSK9 secretion is biphasic during enterocyte differentiation. In the early stages of maturation, PCSK9 is highly secreted with a maximum of 6,6 ng/well 10 days after seeding. Immunoblot for PCSK9 after protein precipitation of basoletral media reveals that the presence of PCSK9 was not due to cell death with

regard to the absence of proPCSK9 (figure 2D). PCSK9 Intracellular concentration was measured by ELISA and western blot. The amount of intracellular PCSK9 increased in early stage of differentiation until day 6 and then decreased to become stable from day 14 to 22 (figure 2B).

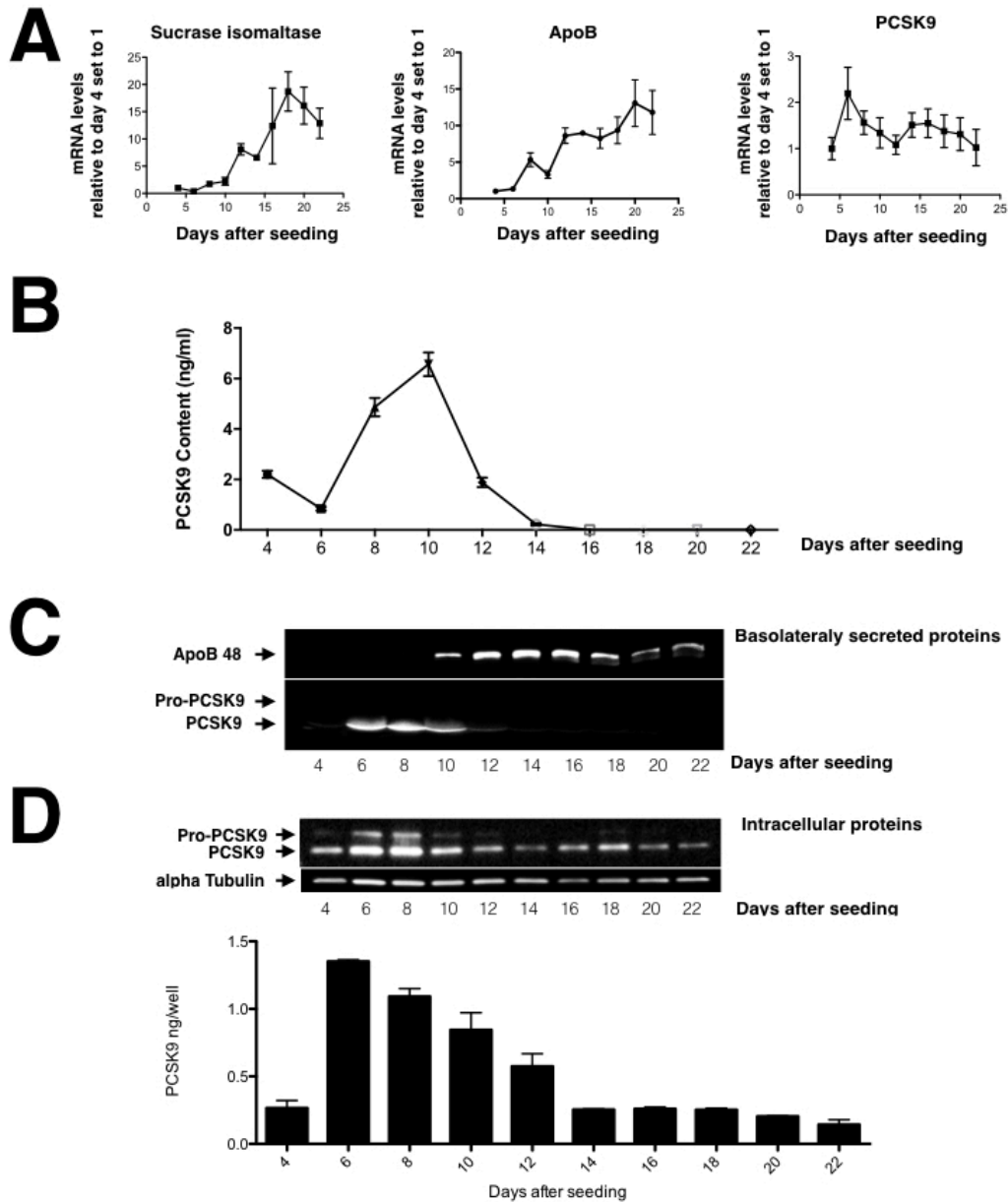


figure 2. Measure of PCSK9 secretion during caco2 cells differentiation. (A) Measure of sucrase isomaltase, apoB and PCSK9 gene expression. All values are relative to day 4 set to 1. **(B)** Measure of PCSK9 content in basolateral media, after a 2h culture, by ELISA. **(C)** Immunoblot of PCSK9 and ApoB content in basolateral media after protein precipitation with acetone. **(D)** Measure of PCSK9 intracellular content by western blot and ELISA. Histograms represents means \pm SEM.

PCSK9 stability is reduced in highly differentiated human Caco-2 cells

We next assess PCSK9 stability in Caco-2 cells at day 8 (pre-mature cell) and 16 (more mature cell). After the addition of cycloheximide, cells were collected at 0h, 1h, 2h, 4h and 6h and PCSK9 was detected by western blot. In pre-mature cells, intracellular PCSK9 content is stable regardless of the time (figure 3A). In contrast, in more mature cells, 4 hours after the addition of cycloheximide, the level of intracellular PCSK9 is massively reduced (figure 3A). To go further we characterize the degradation pathway responsible for the stability difference between day 8 and 16. We show that inhibition of lysosomal degradation by a mix of leupeptin and chloroquine re-establishes a comparable stability between day 8 and 16 (figure 3B).

PCSK9 secretion is decreased during mouse enterocyte differentiation

We hypothesized that, in the gut, like for the Caco-2, PCSK9 secretion could be affected by the state of differentiation of the cell. We isolate intestinal cells regarding the expression of the reporter gene *sox9*. After flow cytometry, three groups of cells were sorted and put in culture for 24h. First, we measure the gene expression of a mature enterocyte marker. We confirm the non-mature state of the Sox9-EGFP low and sublow cells corresponding to intestinal stem cells and cells in differentiation respectively (supplemental data). In the contrary, Sox9-EGFP negative cells, corresponding to mature cells, highly express apoB, Villin, sucrase isomaltase and alkaline phosphatase. PCSK9 gene expression was relatively similar in all groups of cells (figure 4A). On the contrary, the secretion of PCSK9 was significantly reduced in Sox9-EGFP negative cells compared to the Sox9-EGFP low cells (figure 4B).

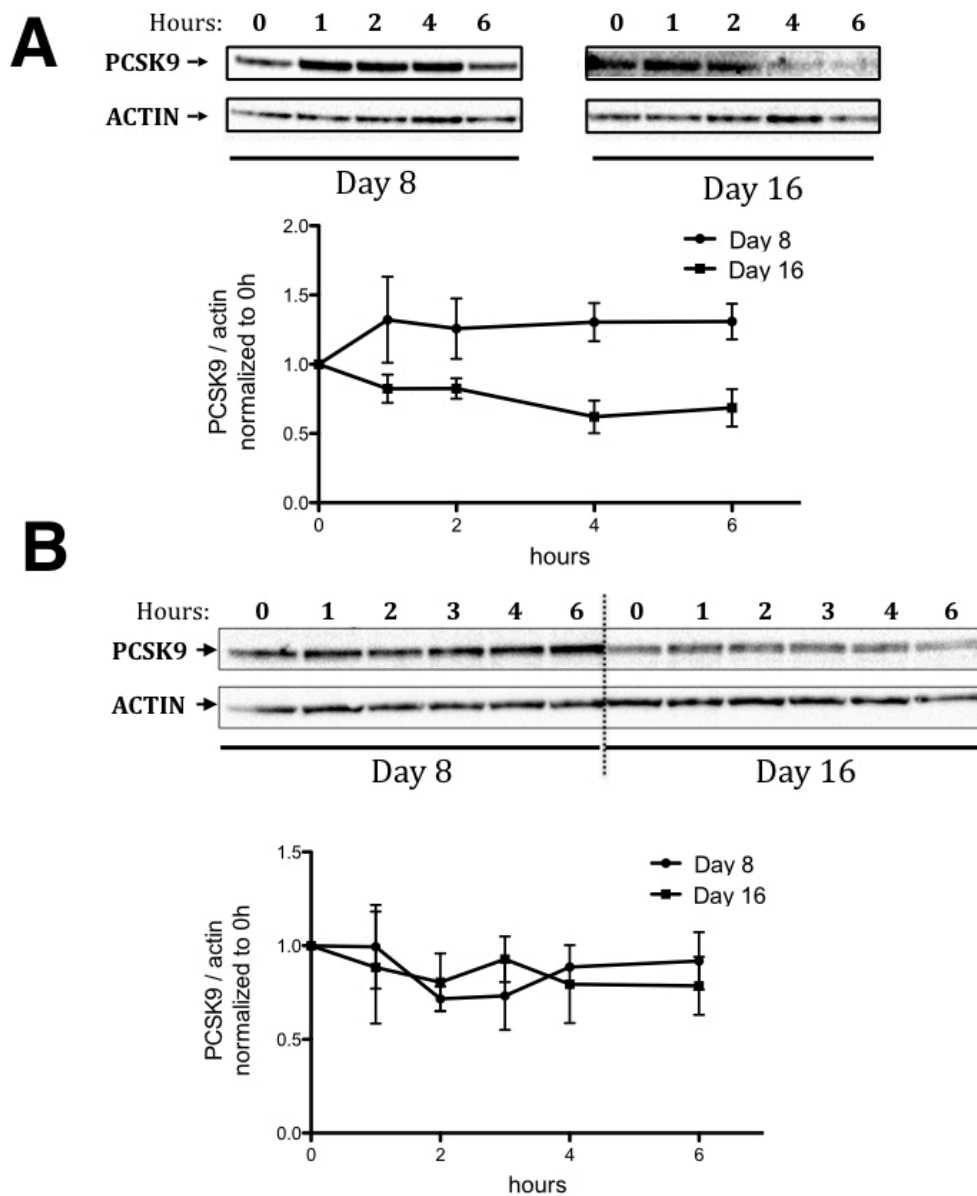


figure 3. PCSK9 stability measurement in absence (A) or presence (B) of lysosomal inhibitors. Cells were treated with 5 μ M of BFA prior to block protein synthesis with 5 μ g/ml of cycloheximide. Immunoblot of PCSK9 on the whole cell lysate collected at different times are shown upper and quantification are represented above.

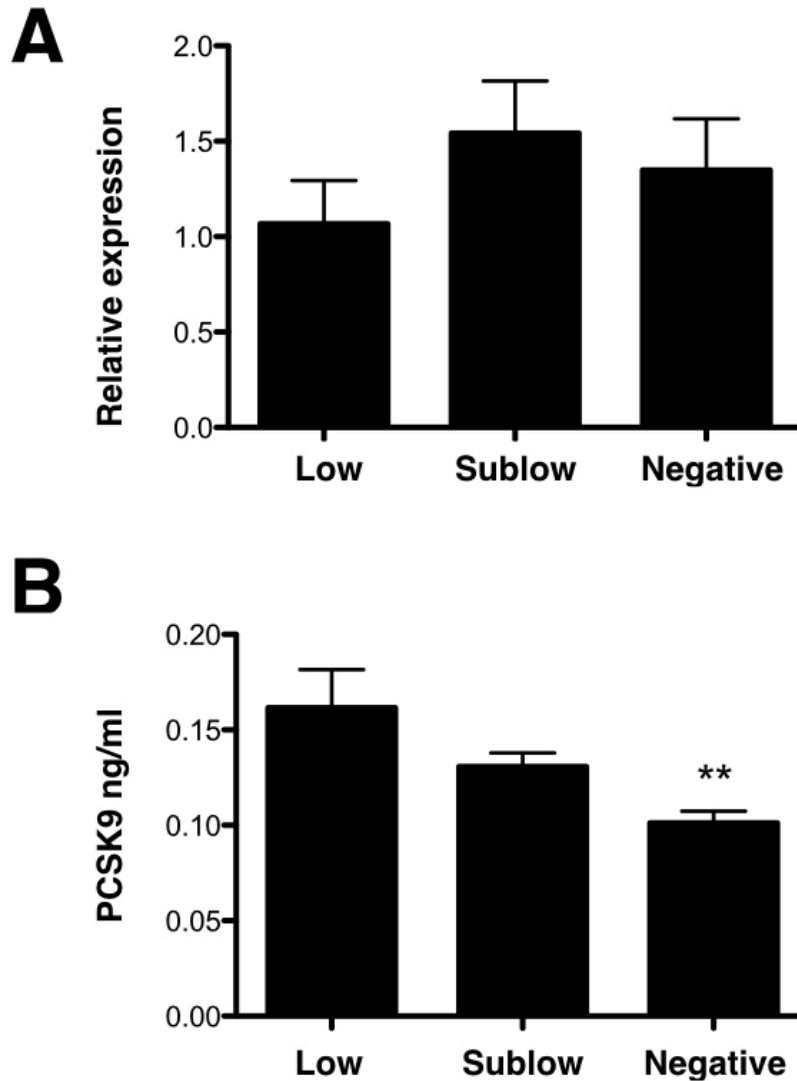


figure 4. Measure of PCSK9 gene and protein expression regarding the stage of cells differentiation. (A) Real time quantitative PCR on PCSK9 in low (intestinal stem cell) sublow (progenitor) and negative (mature cell) cells. **(B)** measure of PCSK9 content, by ELISA, in the media of each group of cell after a 24h culture. Histograms represents means \pm SEM. ** $p < 0.01$; Kruskal wallis test between Low and Negative groups.

PCSK9 trafficking is altered from the golgi

We made the hypothesis that the absence of PCSK9 secretion could be due to an alteration of its trafficking in the cell. The sec24 protein is the only protein known to be involved in PCSK9 secretion by regulating PCSK9 trafficking from the reticulum to the Golgi. Its genetic expression and protein level are increased during enterocyte maturation, suggesting that PCSK9 reaches the golgi regardless of the state of differentiation (figure 5A). We next confirm this hypothesis with the use of endoglycosidase H which allows us to separate the reticular form from the golgi form of a protein. In more mature enterocytes we detect both forms of PCSK9, confirming that PCSK9 is able to reach the golgi in mature enterocytes (figure 5B). However, we show, at day 16, an intense band corresponding to the golgi form of PCSK9 suggesting that PCSK9 is accumulated inside the golgi or between the golgi and the plasmic membrane.

PCSK9 post-translational modifications differ from pre-mature to more mature enterocytes

We assess, by 2D electrophoresis followed by an immunoblot against PCSK9, the global post-translational modifications between day 8 and day 16. The proPCSK9 and the mature form were both localized close to an isoelectric point value of 6 as expected from prediction by several databases (figure 6A). At day 16, we detect another spot with the size of the mature PCSK9 but close to an isoelectric point value of 8 (figure 6B).

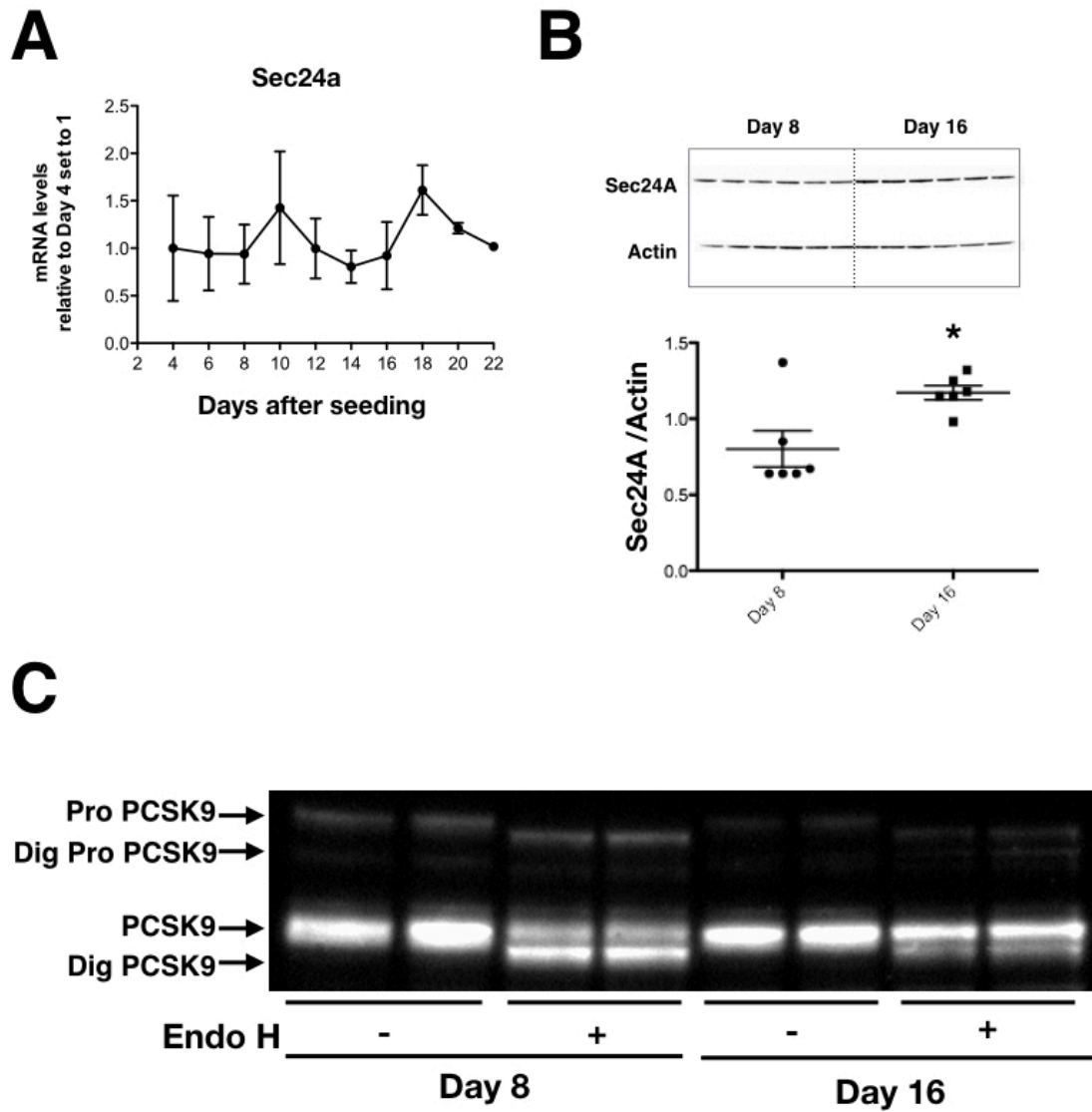


figure 5. Assessment of PCSK9 trafficking along caco2 cell maturation. Measure of SEC24a gene **(A)** and protein **(B)** expression at day 8 and 16. Immunoblot of SEC24a on whole cell lysat are shown in the top and the corresponding quantification are below. Scatter plot represents means \pm SEM. * $p < 0.05$; mann whitney test between day 8 and 16. **(C)** Whole cell lysat were collected at day 8 and 16 and digest with 2500 U of endo-H, followed by an immunoblot of PCSK9. Dig=digested.

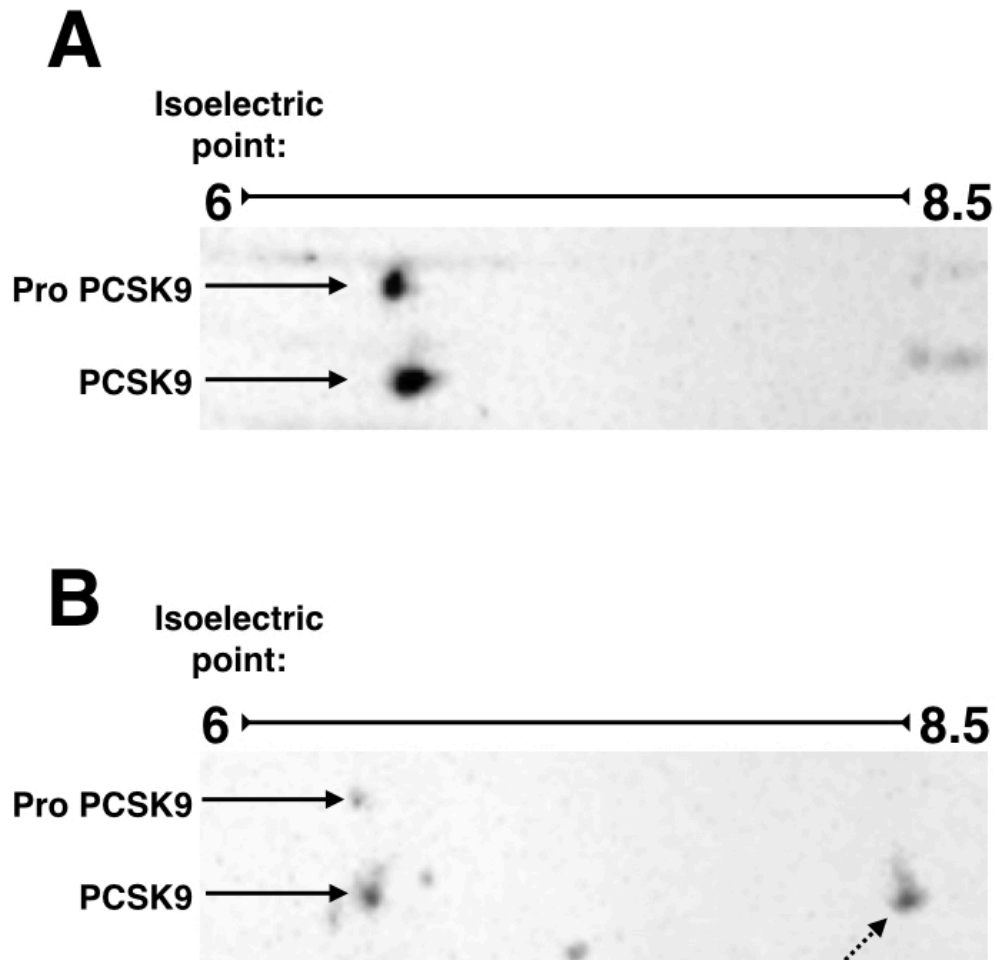


figure 6. Assessment of PCSK9 post-translational modification by 2D electrophoresis. Whole cell lysat were collected at day 8 (**A**) and 16 (**B**) and resolved on 2 dimensional SDS page. Immunoblot were realised with PCSK9 antibody. The supplemental spot appearing at day 16 is marked by a dotted arrow.

PCSK9 glycosylation is modified from pre-mature to more mature enterocyte

PCSK9 is N-glycosylated on asparagin at position 533 (18). We use PNGase f to digest specifically N-glycosylation on PCSK9. At day 8, the digestion by PNGase F induces a small shift of the size of the band corresponding to mature PCSK9 (figure 7A). However, at day 16, PNGase f has no effect on the size of the band corresponding to PCSK9. Interestingly, the proPCSK9 is cleaved by PNGase f at 8 and 16. In regard of the reticular localisation of the proPCSK9 we assess the possibility that the resistance to the PNGase f appear from the golgi. Thus, we use brefeldin A (BFA) to block the protein trafficking between the reticulum and the golgi and inducing accumulation of PCSK9 in the reticulum. The addition of PNGase f on the lysat of cells incubated with BFA allow the switch of size for mature PCSK9 at day 8 and 16 (data not shown). Next we used the PNGase fII, known to be more efficient for the cleavage of N-glycosylation regardless core modification of N-glycosylation, like alpha 1-3 fucosylation, which induces a resistance of N-glycosilation for PNGase f. At day 8, we get the same result with both PNGase f. On the other hand, at day 16, only the PNGase fII allow the clivage of more than 50% of intracellular PCSK9 (figure 7A). Finnally, we measure gene expression of fucosyltransferase 4 and 11, responsible of the addition of a fucose on an alpha(1-3). Both fucosyltransferase gene expression were increased along Caco-2 cells maturation (figure 7B).

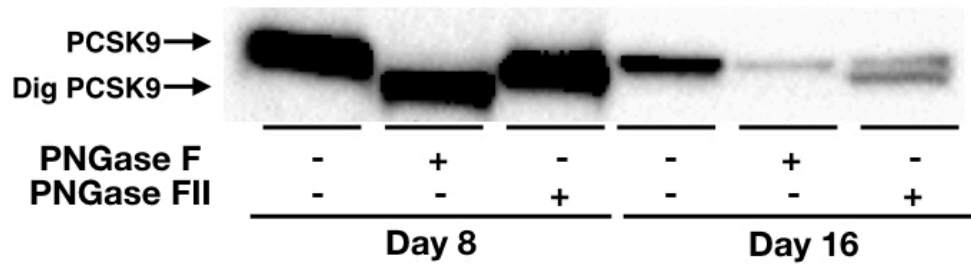
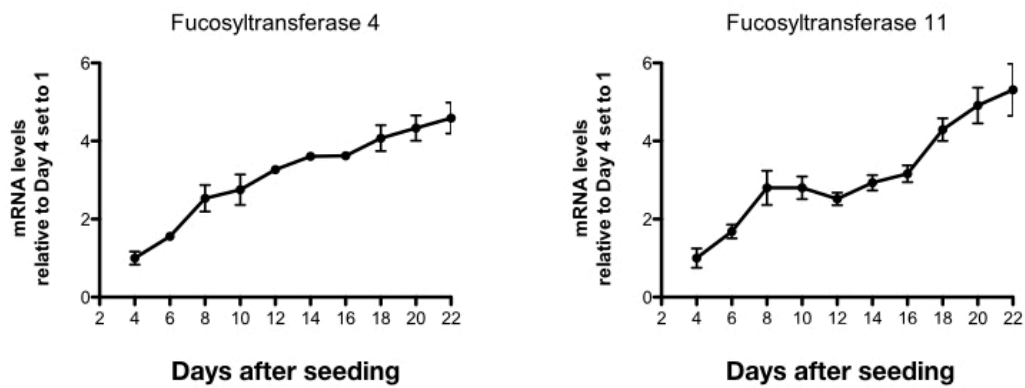
A**B**

figure 7. Assessment of PCSK9 glycosylation. (A) Deglycosylation of PCSK9 by PNGase F and PNGase FII. Whole cell lysat were digest with PNGase F or PNGase FII and resolved on NuPage 8\% bis tris gel. Immunoblot were realised with PCSK9 antibody. **(B)** Gene expression measurement of fucosyltransferase 4 and 11 along caco2 cells maturation.

Discussion

Although a lot of study focus on PCSK9 and how inhibit it, trafficking and secretion are still not fully characterized.

Several study focussing on PCSK9 secretion have highlighted contradictory results regarding the capacity of the small intestine to secrete PCSK9 (5) (12). In their 2008 study, Zaid et al suggest that the liver is the only organ capable of secreting PCSK9 (5). In 2013, Emile levy show that enterocyte, derivating from Caco-2 differentiation, are able to secrete PCSK9 in the basolateral media of transwell insert (12).

In the paper of Zaid et al, the absence of PCSK9 in the systemic circulation of liver knock out mice does not make it possible to conclude definitively that PCSK9 is not secreted by the small intestine (5). A local secretion of PCSK9 by the small intestine directly in the portal blood could not appears in systemic blood. The measure of PCSK9 in several biological compartments of WT mice show same amount of circulating PCSK9 in the portal and systemic blood. More over, the total absence of PCSK9 in the portal blood of PCSK9 L-KO mice revealed that the small intestine res not contribute to circulating level of PCSK9. The hypothesis of a local secretion of PCSK9 was also discarded regarding the absence of PCSK9 in the basolateral media of Ussing chambers from human and mice tissues (results not shown). All this results revealed that PCSK9 is not secreted, even locally, by the small intestine.

The stage of Caco-2 cells differentiation cells seems to affect PCSK9 secretion. in early stages of maturation PCSK9 is highly secreted until to reach more than 6 ng/ml in 2 hours. PCSK9 secretion is maximal at day 10 and start to be reduced until become almost undetectable from the day 16. Highly differentiated Caco-2 lost the ability to secrete PCSK9 in the basolateral media. However, the mature cells maintain a functional secretion activity in regards of the secretion of apoB 48. The absence of pro-PCSK9 form in the media revealed that the secretion

of PCSK9 was not due to cell death. Interestingly, PCSK9 gene expression was relatively stable all along the differentiation. In the gut, PCSK9 secretion is also modulates along intestinal stem cell differentiation into mature enterocyte. Crypt cells localized in the bottom of the intestinal crypt secretes significantly much more PCSK9 compare to mature enterocytes. This results confirm that PCSK9 secretion disappear, or at least is significantly reduced, in mature enterocytes. Intracellular PCSK9 content, in Caco-2 cell, decreases from day 6 to day 14 and stay stable in the mature enterocyte. One of the explanation for this reduction could be attributed to PCSK9 stability. In mature enterocytes PCSK9 is less stable compare to non-mature enterocytes. The re-establishment, after lysosomal degradation, of identical stability between non-mature and mature enterocyte, revealed that this reduction is closely link to lysosomal activity.

When PCSK9 bind the LDLr at the surface of the plasma membrane, both are internalized and degraded by the lysosomal pathway (19). The amount of radio labeled PCSK9 uptake is similar in pre-mature and mature enterocyte. The reduction of PCSK9 content in the basolateral media could not be explained by a greater uptake of PCSK9 by the mature enterocyte.

PCSK9 is secreted by the classical pathway including the Reticulum-Golgi axis. Actually, Sec24a, a protein belonging to COPII complex, is the only protein known to be involved in PCSK9 secretion (20). The genic and protein expression of Sec24a is increased in mature enterocyte. More over, endo H study revealed that PCSK9 trafficking from the reticulum to the golgi is functional regardless the state of differentiation. The major form of intracellular PCSK9 is endo H sensitive (21) (18). In our case, about 60% of intracellular PCSK9 in mature enterocytes is resistant to endo-H, suggesting that the mature PCSK9 accumulated in the cell.

GRP94 is a resident protein of the reticulum, known to be involved in protein folding (22). GRP94 binds to PCSK9, probably to avoid PCSK9-LDLr interaction in the reticulum (22). Mice lacking GRP94 specifically in the liver show an increase of PCSK9 secretion, suggesting a role for GRP94 in PCSK9 secretion. GRP94 gene and protein expression were not affected by Caco-

2 cell differentiation discarding a potential implication of GRP94 in the reduction of PCSK9 secretion (supplemental figure 2). The annexin A2 (AnxA2) is a calcium-regulated membrane-binding protein expressed in lung, liver, small intestine and adrenals (23). AnxA2 binds PCSK9 by its C-terminal domain and its silencing increased PCSK9 secretion in both human and animal cells (23) (24). AnxA2 is highly expressed in Caco-2 cells but stays stable along differentiation (supplemental figure 2). Assessment of AnxA2 binding efficiency between day 8 and 16 would be necessary to eliminate its involvement in PCSK9 secretion reduction.

Post-translational modifications play a major role in several biological functions such as protein trafficking and secretion (25). PCSK9 is sulfated in two sites at position 38 and in the catalytic domain, phosphorylated on two serines at position 47 and 688 and N-glycosylated on an asparagine in position 533 (18) (26) (27). The global assessment, by 2D electrophoresis, of post-translational modifications on PCSK9 along Caco-2 maturation suggests a differential post-translational modification between pre-mature and mature enterocytes. Furthermore, in pre-mature enterocytes, intracellular PCSK9 is totally digested by PNGase F. In contrast, intracellular PCSK9 from mature enterocytes is resistant against PNGase F. These results suggest that glycosylation differs from day 8 to day 16. The presence of an alpha 1-3 fucose in the core of the N-glycosylation induces a resistance to PNGase F. Little is known about fucosylation, especially in mammals where the core alpha 1-3 fucosylation was never described. Another type of fucosylation, alpha 1-6, is described in humans and seems to be involved in liver cancer (28). The inability of core alpha 1-3 fucosylation in mammals can be challenged since the enzymes responsible for this reaction are expressed in mammals. In addition, several independent studies have demonstrated the resistance of mammalian proteins to PNGase F. Thus, Geetha Srikrishna et al show, in bovine, that a large amount of N-glycosylated proteins, present in the lung, are not sensitive to PNGase F (29). In 2016, Villaverde et al revealed that the TEX101 protein present in the rat seminal fluid was not digested by PNGase F whereas the same protein, taken directly

from the rat testis, was partially digested with PNGase f (30). The essential role of this protein in fertility led them to hypothesize that the resistance of TEX101 to PNGase f consisted of a defense mechanism and allowed to protect this protein from the action of glycosidases during epididymal maturation. In our study, the appearance of resistance to PNGase f, at day 16, is associated with a decrease in the stability of PCSK9. Thus, in our context, the modification of the glycosylated group inducing resistance to PNGase f does not increase PCSK9 stability.

The discovery of molecular actors necessary for the secretion of PCSK9 is essential and could lead to the development of therapies targeting the PCSK9 hepatic secretion.

References and Notes

1. Marianne Abifadel, Mathilde Varret, Jean-Pierre Rabès, Delphine Allard, Khadija Ougueram, Martine Devillers, Corinne Cruaud, Suzanne Benjannet, Louise Wickham, Danièle Erlich, et al. Mutations in *pcsk9* cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nature genetics*, 34(2):154–156, 2003.
2. Jonathan Cohen, Alexander Pertsemlidis, Ingrid K Kotowski, Randall Graham, Christine Kim Garcia, and Helen H Hobbs. Low ldl cholesterol in individuals of african descent resulting from frequent nonsense mutations in *pcsk9*. *Nature genetics*, 37(2):161, 2005.
3. Nathan D Wong, Paul D Rosenblit, and Robert S Greenfield. Advances in dyslipidemia management for prevention of atherosclerosis: Pcsk9 monoclonal antibody therapy and beyond. *Cardiovascular diagnosis and therapy*, 7(Suppl 1):S11, 2017.
4. Bertrand Cariou, Karim Si-Tayeb, and Cédric Le May. Role of *pcsk9* beyond liver involvement. *Current opinion in lipidology*, 26(3):155–161, 2015.

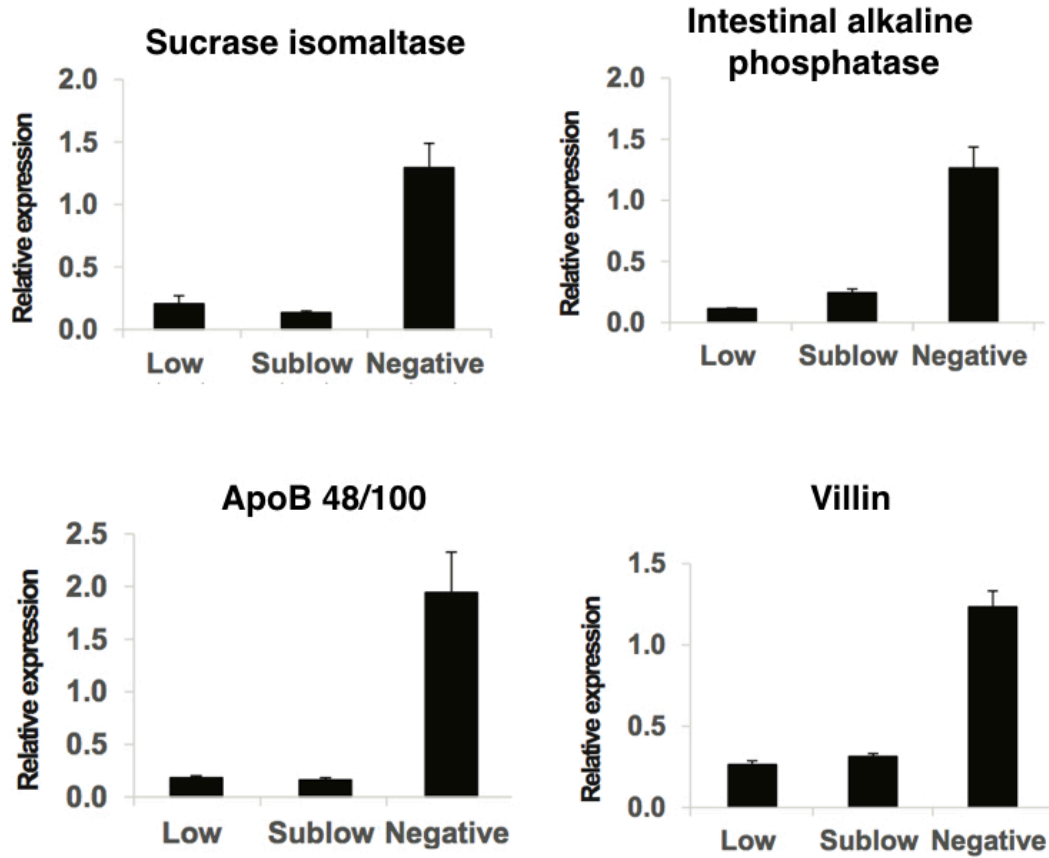
5. Ahmed Zaid, Anna Roubtsova, Rachid Essalmani, Jadwiga Marcinkiewicz, Ann Chamberland, Josée Hamelin, Michel Tremblay, Hélène Jacques, Weijun Jin, Jean Davignon, et al. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (pcsk9): hepatocyte-specific low-density lipoprotein receptor degradation and critical role in mouse liver regeneration. *Hepatology*, 48(2):646–654, 2008.
6. Nabil G Seidah, Suzanne Benjannet, Louise Wickham, Jadwiga Marcinkiewicz, Stéphanie Bélanger Jasmin, Stefano Stifani, Ajoy Basak, Annik Prat, and Michel Chrétien. The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (narc-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(3):928–933, 2003.
7. Claire Blanchard, Francois Moreau, Bertrand Cariou, and Cedric Le May. Trans-intestinal cholesterol excretion (tice): A new route for cholesterol excretion. *Medecine sciences: M/S*, 30(10):896–901, 2014.
8. Shirya Rashid, David E Curtis, Rita Garuti, Norma N Anderson, Yuriy Bashmakov, YK Ho, Robert E Hammer, Young-Ah Moon, and Jay D Horton. Decreased plasma cholesterol and hypersensitivity to statins in mice lacking pcsk9. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(15):5374–5379, 2005.
9. Aldo Grefhorst, Markey C McNutt, Thomas A Lagace, and Jay D Horton. Plasma pcsk9 preferentially reduces liver ldl receptors in mice. *Journal of lipid research*, 49(6):1303–1311, 2008.
10. Cédric Le May, Sanae Kourimate, Cédric Langhi, Maud Chétiveaux, Anne Jarry, Christine Comera, Xavier Collet, Folkert Kuipers, Michel Krempf, Bertrand Cariou, et al. Proprotein

- convertase subtilisin kexin type 9 null mice are protected from postprandial triglyceridemia. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 29(5):684–690, 2009.
11. Cédric Le May, Jean Mathieu Berger, Anne Lespine, Bruno Pillot, Xavier Prieur, Eric Letessier, M Mahmood Hussain, Xavier Collet, Bertrand Cariou, and Philippe Costet. Transintestinal cholesterol excretion is an active metabolic process modulated by pcsk9 and statin involving abcb1. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 33(7):1484–1493, 2013.
 12. Emile Levy, Ali Ben Djoudi Ouadda, Schohraya Spahis, Alain Théophile Sane, Carole Garofalo, Émilie Grenier, Lea Emonnot, Sabrina Yara, Patrick Couture, Jean-François Beaulieu, et al. Pcsk9 plays a significant role in cholesterol homeostasis and lipid transport in intestinal epithelial cells. *Atherosclerosis*, 227(2):297–306, 2013.
 13. Eric J Formeister, Ayn L Sionas, David K Lorance, Carey L Barkley, Ginny H Lee, and Scott T Magness. Distinct sox9 levels differentially mark stem/progenitor populations and enteroendocrine cells of the small intestine epithelium. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 296(5):G1108–G1118, 2009.
 14. Laurianne Van Landeghem, M Agostina Santoro, Adrienne E Krebs, Amanda T Mah, Jeffrey J Dehmer, Adam D Gracz, Brooks P Scull, Kirk McNaughton, Scott T Magness, and P Kay Lund. Activation of two distinct sox9-egfp-expressing intestinal stem cell populations during crypt regeneration after irradiation. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 302(10):G1111–G1132, 2012.
 15. Adam D Gracz, Sendhilnathan Ramalingam, and Scott T Magness. Sox9 expression marks a subset of cd24-expressing small intestine epithelial stem cells that form organoids in vitro.

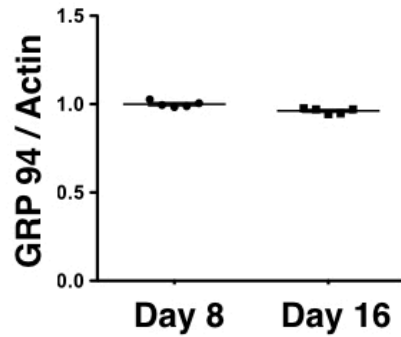
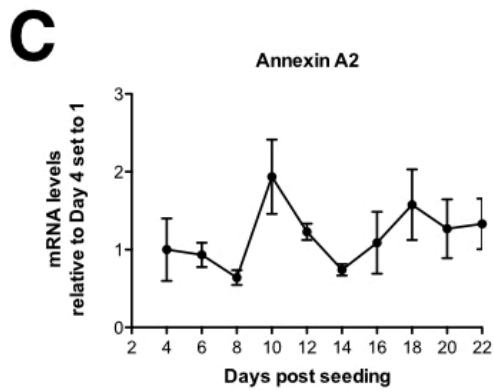
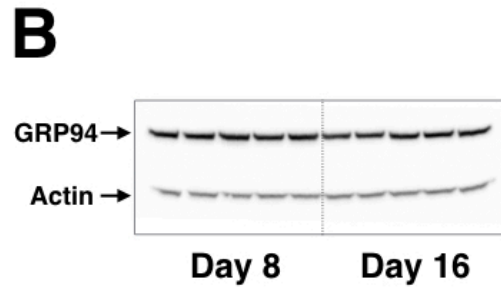
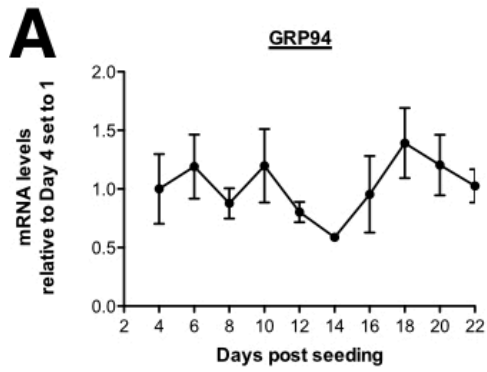
- American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 298(5):G590–G600, 2010.
16. Amy E Levenson, R Paul Wadwa, Amy S Shah, Philip R Khoury, Thomas R Kimball, Elaine M Urbina, Sarah D de Ferranti, Franziska K Bishop, David M Maahs, Lawrence M Dolan, et al. Pcsk9 is increased in youth with type 1 diabetes. *Diabetes Care*, 40(7):e85–e87, 2017.
 17. Anna Roubtsova, Ann Chamberland, Jadwiga Marcinkiewicz, Rachid Essalmani, Ali Fazel, John J Bergeron, Nabil G Seidah, and Annik Prat. Pcsk9 deficiency unmasks a sex-and tissue-specific subcellular distribution of the ldl and vldl receptors in mice. *Journal of lipid research*, 56(11):2133–2142, 2015.
 18. Suzanne Benjannet, David Rhainds, Josée Hamelin, Nasha Nassoury, and Nabil G Seidah. The proprotein convertase (pc) pcsk9 is inactivated by furin and/or pc5/6a functional consequences of natural mutations and post-translational modifications. *Journal of Biological Chemistry*, 281(41):30561–30572, 2006.
 19. Kara N Maxwell and Jan L Breslow. Adenoviral-mediated expression of pcsk9 in mice results in a low-density lipoprotein receptor knockout phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(18):7100–7105, 2004.
 20. Xiao-Wei Chen, He Wang, Kanika Bajaj, Pengcheng Zhang, Zhuo-Xian Meng, Danjun Ma, Yongsheng Bai, Hui-Hui Liu, Elizabeth Adams, Andrea Baines, et al. Sec24a deficiency lowers plasma cholesterol through reduced pcsk9 secretion. *Elife*, 2:e00444, 2013.
 21. Zhenze Zhao, Yetsa Tuakli-Wosornu, Thomas A Lagace, Lisa Kinch, Nicholas V Grishin, Jay D Horton, Jonathan C Cohen, and Helen H Hobbs. Molecular characterization of

- loss-of-function mutations in pcsk9 and identification of a compound heterozygote. *The American Journal of Human Genetics*, 79(3):514–523, 2006.
22. Steve Poirier, Maya Mamarbachi, Wan-Ting Chen, Amy S Lee, and Gaetan Mayer. Grp94 regulates circulating cholesterol levels through blockade of pcsk9-induced ldlr degradation. *Cell reports*, 13(10):2064–2071, 2015.
23. Gaétan Mayer, Steve Poirier, and Nabil G Seidah. Annexin a2 is a c-terminal pcsk9-binding protein that regulates endogenous low density lipoprotein receptor levels. *Journal of Biological Chemistry*, 283(46):31791–31801, 2008.
24. Nabil G Seidah, Steve Poirier, Maxime Denis, Rex Parker, Bowman Miao, Claudio Mapelli, Annik Prat, Hanny Wassef, Jean Davignon, Katherine A Hajjar, et al. Annexin a2 is a natural extrahepatic inhibitor of the pcsk9-induced ldl receptor degradation. *PloS one*, 7(7):e41865, 2012.
25. FM Klis, AFJ Ram, RC Montijn, JC Kapteyn, LHP Caro, JH Vossen, MAA Van Berkel, SSC Brekelmans, and H Van den Ende. 13 posttranslational modifications of secretory proteins. *Methods in microbiology*, 26:223–238, 1998.
26. Thilina Dewpura, Angela Raymond, Josée Hamelin, Nabil G Seidah, Majambu Mbikay, Michel Chrétien, and Janice Mayne. Pcsk9 is phosphorylated by a golgi casein kinase-like kinase ex vivo and circulates as a phosphoprotein in humans. *The FEBS journal*, 275(13):3480–3493, 2008.
27. Vincent S Tagliabracci, Sandra E Wiley, Xiao Guo, Lisa N Kinch, Eric Durrant, Jianzhong Wen, Junyu Xiao, Jixin Cui, Kim B Nguyen, James L Engel, et al. A single kinase generates the majority of the secreted phosphoproteome. *Cell*, 161(7):1619–1632, 2015.

28. Eiji Miyoshi, Kenta Moriwaki, Naoko Terao, Cheng-Cheng Tan, Mika Terao, Tsutomu Nakagawa, Hitoshi Matsumoto, Shinichiro Shinzaki, and Yoshihiro Kamada. Fucosylation is a promising target for cancer diagnosis and therapy. *Biomolecules*, 2(1):34–45, 2012.
29. Geetha Srikrishna, Derek K Toomre, Adriana Manzi, Krishnasamy Panneerselvam, Hudson H Freeze, Ajit Varki, and Nissi M Varki. A novel anionic modification of n-glycans on mammalian endothelial cells is recognized by activated neutrophils and modulates acute inflammatory responses. *The Journal of Immunology*, 166(1):624–632, 2001.
30. Ana Izabel Silva Balbin Villaverde, Louise Hetherington, and Mark A Baker. Quantitative glycopeptide changes in rat sperm during epididymal transit. *Biology of reproduction*, 94(4), 2016.



Supplemental figure 1. Measure of Mature enterocyte gene marker expression regarding the stage of cells differentiation. Real time quantitative PCR on sucrase isomaltase, intestinal alkaline phosphatase, apoB 48/100 and villin in low (intestinal stem cell) sublow (progenitor) and negative (mature cell) cells. Histograms represents means \pm SEM.



Supplemental figure 2. Assessment of gene and protein expression of protein involved in PCSK9 secretion. Measure of GRP94 **(A)** and Annexin A2 **(C)** gene expression, by real time PCR, along caco2 cells maturation. **(B)** Immunoblot of GRP94 on whole cell lysat are shown upper and the corresponding quantification are below. Scatter plot represents means \pm SEM.

Gene name	Forward	Reverse
PCSK9	GTCTTCCATGGCCTTCTTCCT	TAATCCGCTCCAGGTTCCA
Sucrase isomaltase	CGTTTAAACGGACTCCCTCAATTT	TGGCACGTCGACCTATGGA
ApoB	GTCCCATGAGCAGGAAGTG	CTAAGATTCCCCAGTCCTCAG
Sec24a	ATGTCCAGCCGGAATAC	AGGACCGTTGGTGTAGGGAG
Annexin A2	GAGCGGGATGCTTTGAACATT	TAGGCGAAGGCAATATCCTGT
GRP94	GCTGACGATGAAGTTGATGTGG	CATCCGTCCTTGATCCTTCTCTA
Fucosyltransferase 4	GATCTGCGCGTCTTGGACTA	GAGGGCGACTCGAAGTTCAT
Fucosyltransferase 11	TTCTACGGCACACAGACTTCCG	AGTGGCGACTGAAGGTGGA

Supplemental figure 3. Primer sequences used for real time PCR.

TROISIÈME PARTIE

Discussion

Discussion

Depuis les premières descriptions scientifiques d'Alessandro Benedetti en 1497 jusqu'au XXème siècle, l'intestin a été cantonné à un rôle passif dans la digestion et l'absorption des aliments. En réalité, il occupe une place majeure dans le métabolisme lipidique et en particulier dans celui du cholestérol. En plus de son rôle dans la digestion des lipides, il regroupe les différents flux de cholestérol. Ainsi, l'intestin porte le flux de cholestérol du compartiment luminal au compartiment plasmatique via l'absorption de cholestérol et la sécrétion des chylomicrons et des HDL. À l'inverse, au travers du TICE l'intestin favorise le passage du cholestérol du compartiment sanguin à la lumière intestinale. Ces différents processus ne sont pas réalisés avec la même efficacité en fonction du segment intestinal. Ainsi, le TICE est majoritaire dans la partie proximale et décroît tout au long du tractus digestif [378]. De la même façon, l'absorption intestinale de cholestérol a lieu majoritairement dans la partie haute de l'intestin, principalement dans le duodénum et la zone proximale du jéjunum [474] [475].

Notre première étude s'est penchée sur les conséquences métaboliques des chirurgies bariatriques. L'amélioration du profil métabolique après chirurgie a été décrit dans de nombreuses études [465] [466]. Buchwald et al. montrent, dans une méta-analyse de 2004, que la réduction de la triglycéridémie et la hausse des niveaux de HDLc sont comparables entre la sleeve gastrectomie et le by-pass Roux en Y (RYGB). En revanche, la réduction de la cholestérolémie varie du simple au triple après une sleeve ou un by-pass respectivement [476]. Les mécanismes moléculaires à l'origine des changements métaboliques post-chirurgie étant très mal connues nous avons souhaité mesurer les différents flux de cholestérol à l'issue de la sleeve et du By-pass. Nous avons, au sein de notre équipe, développé plusieurs modèles de chirurgies bariatriques chez la souris. Nous avons ainsi adapté la sleeve et le RYGB chez l'animal. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans le journal JOVE [436]. En plus d'une perte de poids significative, la sleeve entraîne une

réduction modeste et transitoire de la cholestérolémie sans altération de l'excrétion fécale de cholestérol. Cet effet semble dépendant de la modification de la prise alimentaire car les animaux « Pair-fed » ont un phénotype similaire. Le by-pass a des effets hypocholestérolémiantes beaucoup plus marqués et durables dans le temps, qui s'accompagne d'une robuste augmentation de l'excrétion fécale de cholestérol. Nos travaux montrent ainsi que la baisse de la cholestérolémie post by-pass est imputable à deux éléments complémentaires : une stimulation du TICE de 49% et une réduction concomitante de la capacité intestinale à absorber le cholestérol. De manière intéressante, la réduction de la capacité de l'intestin à absorber le cholestérol a déjà été rapportée dans des études cliniques [477]. Notre explication de la baisse de la capacité de l'intestin à absorber le cholestérol à l'issue du by-pass n'est malheureusement que spéculative. L'analyse transcriptionnelle des transporteurs impliqués dans l'absorption intestinale montre que ni l'expression de NPC1L1, ni celle de l'hétérodimère ABCG5/G8 n'est affectée par le by-pass. La capacité absorptive pourrait être simplement modifiée par la chirurgie. En effet, le duodenum est court circuité pour former l'anse biliaire et n'est plus en contact avec le bol alimentaire. En conséquence, l'action digestive des acides biliaires et des enzymes pancréatiques et la formation des micelles requise à une bonne absorption sont reléguées au jéjunum et à l'iléon. En effet, la digestion des lipides dépend de lipases produites par les glandes salivaires, l'estomac et le pancréas. Bien que les TG alimentaires ne soient pas en contact avec la lipase pancréatique avant l'anastomose de l'anse biliaire, ils peuvent être digérés, en partie, par les lipases gastriques et linguales. En revanche, l'hydrolyse du cholestérol dépend uniquement de la cholestérol estérase, produite par le pancréas. Ainsi, la digestion du cholestérol ne pourra avoir lieu que dans l'anse commune, où les enzymes pancréatiques et le bol alimentaire se rejoignent. De plus, la micellisation du cholestérol, favorisée par les acides biliaires étant nécessaire à son absorption, cette dernière ne pourra être optimale que dans l'anse commune.

Le TICE est une voie qui reste à ce jour très mal caractérisée et seuls quelques transporteurs intestinaux ont pu être identifiés [380] [378] [393]. L'expression génique intestinale du LDLR, de NPC1L1, et d'ABCG5/G8 n'est cependant pas significativement altérée par le by-pass. Du fait de sa capacité à réabsorber une partie du cholestérol excrété par le TICE dans la lumière, il est physiologiquement difficile de dissocier le TICE de l'absorption intestinale. Ainsi, l'inhibition de l'absorption intestinale de cholestérol, par l'ezetimibe,

stimule le TICE [393]. Notre méthode d'exploration du TICE *in vivo*, la cannulation biliaire/perfusion intestinale, présente le défaut d'inhiber quasiment totalement la capacité de l'intestin à absorber le cholestérol luminal (Le May C. et al - Données non publiées). Elle permet en revanche de mesurer très précisément le flux sortant. Il est donc très probable que l'effet synergique de la perte de capacité absorptive et de la stimulation de l'efflux transintestinal explique la forte élimination du cholestérol par voie fécale. Pour des raisons techniques, il n'a pas été possible de spécifiquement mesurer le TICE dans l'anse biliaire, alimentaire ou commune. La mesure du TICE est la résultante des 3 segments et représente donc une quantification intégrée. La mesure du TICE dans chaque segment aurait en revanche permis de mieux comprendre l'induction transintestinale. Il a été mis en évidence que le jeûne prolongé induit fortement le TICE [387]. On peut donc imaginer que le TICE dans l'anse biliaire pourrait être fortement accru. A l'inverse, l'anse alimentaire, dépourvue de la présence d'accepteurs de cholestérol (acides biliaires et phospholipides d'origine biliaire), pourrait avoir un TICE réduit. Le TICE est aussi régulé par la quantité et la nature des acides biliaires présents dans la lumière [378] [385]. Nos données montrent de fortes altérations des acides biliaires au niveau fécal et plasmatique. Nous n'avons pas eu la possibilité de doser l'excrétion biliaire des acides biliaires et la quantité d'acides biliaires luminaux. Un autre groupe expérimental sera donc nécessaire pour mieux comprendre le phénotype des souris by-pass. Nous développons également actuellement un modèle de diversion biliaire afin de déterminer si ce modèle peut mimer l'effet du by-pass sur le TICE. Ces travaux ont fait l'objet d'un article publié dans International Journal of Obesity (In press).

La mise en place d'un protocole de mesure du TICE à l'aide d'isotopes stables du cholestérol nous a permis d'envisager la mesure du TICE chez l'humain. Afin de récupérer, dans les fèces, uniquement le cholestérol marqué d'origine transintestinale nous nous sommes tournés vers des patients dont l'état médical a nécessité la mise en place d'un drain biliaire externe. Nous avons ainsi pu mesurer, en GC-MS, l'apparition du traceur de cholestérol dans les fèces de deux patients 2 à 3 jours après l'injection intraveineuse de 100 mg de D7-cholestérol. Comme détaillé précédemment, l'absence d'acides biliaires dans la lumière intestinale réduit le TICE et suggère donc que l'efflux transintestinal de cholestérol mesuré est sous évalué. L'absence de donnée d'excrétion fécale a limité la mesure quantitative du TICE et la comparaison avec l'efflux biliaire de cholestérol.

Cette étude constitue la première preuve directe de l'existence du TICE chez l'homme et pourrait permettre le développement de stratégies thérapeutiques ciblant le TICE afin d'enrichir l'arsenal thérapeutique destiné à réduire les risques cardiovasculaires chez les patients hypercholestérolémiques.

Le développement de modèles de chirurgies bariatriques chez la souris nous a également permis de nous intéresser aux conséquences de la sleeve sur les différentes fonctions digestives telles que le transit ou la perméabilité intestinale. Nous avons ainsi pu montrer que la sleeve modifiait la perméabilité intestinale de façon différentielle en fonction de la zone proximale ou distale de l'intestin. Ainsi, la sleeve réduit, au niveau jéjunal, la perméabilité para- et trans-cellulaire. A l'inverse, la perméabilité para- et trans-cellulaire sont augmentées au niveau du colon. En réponse à l'augmentation de la perméabilité, les niveaux plasmatiques de LPS sont augmentés après la sleeve, sans pour autant altérer l'amélioration du profil glycémique. Ces travaux ont fait l'objet d'un article publié dans *Obesity surgery* [478].

De façon intrigante, nous avons mesuré une très forte augmentation de l'expression de PCSK9 dans les anses biliaires, alimentaires et communes après by-pass. Cette augmentation ne permet pas d'expliquer l'induction du TICE car PCSK9 le régule négativement [380]. En revanche, le by-pass s'accompagne d'une modification majeure de la structure anatomique de l'intestin [479] avec une hypertrophie des anses biliaires et alimentaires et un raccourcissement de plus de la moitié de la longueur de l'anse alimentaire. Plusieurs études ont suggéré que PCSK9 aurait un rôle important dans la régénération hépatique [469], dans la différenciation cellulaire [89] et dans la prolifération cellulaire (Si-Tayeb K. et al - données non publiées). Le groupe de Nabil Seidah, dans son étude de 2003, montre que PCSK9 est fortement exprimée dans le foie, le rein, l'intestin et dans le cerveau, à des étapes clés de l'embryogénèse [89]. Dans une seconde étude, ils constatent que l'absence de PCSK9 ralentit la régénération hépatique après hépatectomie [469].

Il serait intéressant de reproduire nos expériences de chirurgies bariatriques sur nos souris PCSK9 KO afin de déterminer les conséquences de la déficience en PCSK9 sur le métabolisme lipidique et sur l'adaptation tissulaire aux chirurgies. Le développement, au sein du laboratoire, de souris présentant une délétion intestin spécifique permettrait également de préciser le rôle relatif des formes intestinales et hépatiques de PCSK9 sur les modifications apportées par les chirurgies bariatriques.

Notre seconde étude s'est focalisée sur la capacité de l'intestin à sécréter ou non PCSK9. Ces travaux sont nés de deux études aux résultats à priori contradictoires. En 2008, le groupe de Nabil Seidah montrait, *in vivo*, chez des souris présentant une déficience hépatique de PCSK9 (liver ko), que le foie est le seul organe capable de sécréter PCSK9 [469]. Tandis qu'en 2013, Emile Levy montrait que des cellules entérocytaires humaines, les Caco2, sont capables de sécréter PCSK9 [89].

Nous avons, dans un premier temps, posé l'hypothèse que l'intestin pourrait sécréter PCSK9 soit dans la veine porte soit dans la circulation lymphatique et ainsi affecter le métabolisme hépatique en réponse à un stimulus nutritionnel. La comparaison par ELISA des concentrations de PCSK9 dans le sang périphérique, le sang portal et la lymphe du canal mésentérique n'a pas montré de différence. De même, nous n'avons pas détecté de PCSK9 dans la veine porte des souris PCSK9 liver KO suggérant la contribution mineure voire nulle de l'intestin dans les formes plasmatiques de PCSK9. Une possible sécrétion locale par l'intestin à également été écartée. En effet, la mesure, en chambre d'Ussing, de la sécrétion de PCSK9 par des explants humains (colon) et murins (duodénum, jéjunum, iléon et colon) s'est révélée négative. En revanche, nous avons confirmé que les cellules Caco-2 sont capables de sécréter PCSK9. Cette sécrétion semble, cependant, dépendante du niveau de différenciation des cellules. Au cours de la maturation cellulaire, la sécrétion de PCSK9 est biphasique. Durant les premiers jours de différenciation, PCSK9 est fortement sécrétée par les cellules Caco-2 au niveau basolatéral. Dix jours après l'ensemencement, la sécrétion décroît jusqu'à atteindre des niveaux indétectables après le jour 16. Les entérocytes matures perdent ainsi leur capacité à sécréter PCSK9, bien qu'ils maintiennent une activité sécrétrice fonctionnelle de l'ApoB 48. Deux phénomènes permettent d'expliquer cette perte de l'activité sécrétrice : 1) une baisse du contenu intracellulaire des cellules en PCSK9 et 2) une altération des voies post-Golgiennes de sécrétion de PCSK9. La baisse des niveaux intracellulaires est un mécanisme post-transcriptionnel lié à une diminution de la stabilité intracellulaire de PCSK9. En effet, 4 heures après l'inhibition de la traduction protéique par la cycloheximide, les niveaux intracellulaires de PCSK9 sont fortement réduits dans les cellules à 16 jours de différenciation tandis qu'à J8, le contenu intracellulaire ne varie pas durant les 8 heures qui suivent le blocage de la traduction protéique. De plus, l'inhibition de la voie de dégradation lysosomale rétablit une stabilité similaire entre J8 et J16 suggérant que la réduction de la stabilité de PCSK9

à J16 est dépendante du lysosome. Nous avons ensuite vérifié si le transit entre le RE et l'appareil de Golgi pouvait être altéré par l'état de différenciation entérocytaire. Nous avons donc comparé la localisation subcellulaire de PCSK9 entre J8 et J16 à l'aide de l'endoglycosidase H ou Endo H. L'endo H, isolée à partir du streptomycines plicatus, est une Endo- β -N-acetylglucosaminidase clivant entre les deux résidus N-acétylglucosamine (figure 10.1) (Tarentino 1989). Le retrait des mannoses au sein du Golgi bloque l'action de l'endo H. Ainsi, les protéines, au cours de leur maturation, vont développer une résistance à l'endo H dès leur entrée dans le Golgi. A J8, nous avons observé que 60% de PCSK9 est sensible à l'endoH et donc se trouve dans le RE et 40% est résistant et donc dans le Golgi. Ce résultat est conforme à des données précédemment publiées montrant que la forme intracellulaire de PCSK9 est majoritairement sensible à l'endo H, la forme résistante étant directement sécrétée [480] [116]. A J16, ces pourcentages sont inversés ; ce qui suggère 1) que le transport RE-Golgi est fonctionnel ; 2) que PCSK9 s'accumule dans le Golgi et que les voies de sécrétion post-Golgi sont probablement dysfonctionnelles. Nous avons également quantifié par Q-PCR et Western-blot, l'abondance de la protéine SEC24a. SEC24A est une protéine cytosolique dont la présence est requise pour transporter PCSK9 du RE au Golgi. Nos données valident que son expression n'est pas réduite au cours de la différenciation.

Les modifications post-traductionnelles semblent jouer un rôle essentiel dans l'adressage protéique. Trois types de modifications ont été rapportées dans la littérature pour PCSK9 : la phosphorylation, la sulfatation et la N-glycosylation [116] [114] [115]. Une étude globale des modifications post-traductionnelles de PCSK9, par électrophorèse 2D, a mis en évidence l'apparition d'une nouvelle forme de PCSK9 à J16, suggérant que les modifications post-traductionnelles diffèrent selon l'état de différenciation.

PCSK9 est phosphorylable [114], trois sites possibles de phosphorylation ont été décrits : les sérines 47, 668 et 688 [114]. Les mutations R46L et A53V altèrent la phosphorylation de la sérine en position 47 mais ne semblent pas modifier la sécrétion de PCSK9, suggérant que la phosphorylation de la sérine 47 n'est pas nécessaire pour la sécrétion de PCSK9. Une kinase a été récemment décrite comme étant capable de phosphoryler PCSK9 sur les 3 sites décrits : la kinase FAM20c [115]. La phosphorylation des sites 668 et 688 pourrait être nécessaire à sa sécrétion puisque l'inhibition de FAM20c réduit fortement la sécrétion de PCSK9 [115]. Nous avons utilisé plusieurs méthodes afin de déterminer si

l'état de phosphorylation pouvait être affecté au cours de la différenciation. La première stratégie consistait à détecter, par spectrométrie de masse couplée à une chromatographie en phase liquide (LC-MS), les séquences phosphorylées identifiées sur PCSK9 après immunoprécipitation. Cette étape a été réalisée en collaboration avec une plate-forme de protéomique à Sherbrooke (Canada) et dirigée par Robert Day, un de nos collaborateurs au sein du réseau Leducq. Bien qu'ils recouvrent environ 75-80% de la séquence totale de PCSK9, ils n'ont, malheureusement, pas été en mesure de détecter spécifiquement les séquences contenant les sérines phosphorylées. Une seconde stratégie consistait à détecter les formes phosphorylées de PCSK9 à l'aide de deux types de gels : les gels phos-tag et les gels IEF (isoelectric focussing). Le gel phos-tag est un gel d'agarose contenant du Zn^{2+} permettant de fixer les groupements phosphorylés. Ainsi, plus une protéine est phosphorylée plus sa migration au sein du gel est limitée. Les gels IEF permettent de faire migrer les protéines en fonction de leur charge. L'addition de groupements phosphorylés, modifiant leur charge, affecte leur migration dans le gel. La préparation des échantillons en amont pour ces deux types de gels nécessite certaines précautions, notamment l'absence de sels ou d'EDTA. Malgré le respect du protocole l'étape de transfert pour le gel phos-tag et celle de la migration pour le gel IEF n'ont pas fonctionné. Nous n'avons donc, à ce jour, aucun argument nous permettant de conclure à un possible état de phosphorylation différentiel de PCSK9 selon l'état de maturation des Caco-2.

Afin de caractériser les conséquences des phosphorylations sur la sécrétion de PCSK9, nous avons développé une série de constructions mimant la présence ou l'absence constitutive de phosphorylation. Nous sommes partis d'un plasmide contenant le gène codant pour la forme sauvage de PCSK9 associé à un tag V5. Nous nous sommes focalisés sur trois sites de phosphorylation : les sérines en position 47 et 688, sites validés dans la littérature et la sérine 668 validée par des algorithmes de prédiction. Afin de mimer une phosphorylation constitutive, la sérine (S) a été substituée par un acide glutamique (E) par mutagenèse dirigée (PCR). À l'inverse, l'absence constitutive de phosphorylation est rendue possible par la substitution de la sérine par une alanine (A). Nos résultats préliminaires semblent indiquer que l'absence de phosphorylation en position 668 et 688 n'affecte pas la sécrétion de PCSK9. De plus, la présence constitutive d'une phosphorylation en position 47 ne modifie pas la capacité de PCSK9 à être sécrétée. Les autres constructions (S47A, S668E, S688E, S535A et S535E) sont en cours de développement.

PCSK9 possède également 2 sites de sulfatation, le premier en position 38 et le second dans le domaine catalytique mais dont la position exacte n'est pas connue [116]. Cependant, les travaux de Dewpura et al montrent que l'inhibition de la sulfatation de PCSK9 par le NACLO₃, n'altère pas sa sécrétion [114]. Nous n'avons pas déterminé si la sulfatation de PCSK9 était altérée au cours de la différenciation.

PCSK9 possède un seul site décrit de N-glycosylation en position 533. Les glycosylations étant impliquées dans l'adressage et la sécrétion des protéines, nous avons souhaité déterminer si l'état de glycosylation de PCSK9 pouvait être différentiel au cours de la maturation entérocytaire. Nous avons dans un premier temps employé la Peptide N-Glycosidase F (PNGase F), obtenue à partir de *flavobacterium meningosepticum* et permettant de retirer spécifiquement la totalité du groupement N-glycosylé, puisqu'elle clive entre l'asparagine et la N-acétylglucosamine (figure 10.1). Huit jours après ensemencement, la totalité de la forme intracellulaire de PCSK9 est digérée par la PNGase F. Ainsi, la forme intestinale de PCSK9, tout comme la forme hépatique, est N-glycosylée [116]. De plus, nos résultats suggèrent que la totalité de la forme intracellulaire à J8 est N-glycosylée. A l'inverse, à J16, PCSK9 n'est plus sensible à la PNGase F. Ces résultats semblent montrer que PCSK9 est bien N-glycosylée dans les entérocytes différenciés mais que la N-glycosylation est résistante à l'action de la PNGase F. Ces données nous ont orientés vers une possible fucosylation de la N-glycosylation. En effet, il a été montré que l'ajout d'un fucose en position alpha 1-3 sur le premier N-acétylglucosamine induit une résistance à la PNGase f [481] (figure 10.1). En revanche, la PNGase fII, dont le fonctionnement est similaire à celui de la PNGase F à la différence qu'elle n'est pas sensible à la fucosylation, clive plus de 50% de la forme intracellulaire de PCSK9 à J16. Il existe 3 grands types de fucosylation associée aux N-glycosylations en fonction de la position de la liaison qu'elles établissent avec le groupement glycosylé. On distingue ainsi, les fucosylations en position alpha 1-2, 1-3 et 1-6 [482]. L'ajout du groupement fucose peut avoir lieu au niveau du corps central ou de l'antenne de la N-glycosylation. Cependant, chez les mammifères, seule la fucosylation en position alpha 1-6 a été identifiée dans le corps central [483]. En effet, la fucosylation alpha 1-3 dans le corps central de la N-glycosylation a été uniquement décrite dans les plantes, les insectes et les mollusques [484] [485]. L'impossibilité d'une fucosylation en alpha 1-3 chez les mammifères peut être remise en question puisque les enzymes responsables de cette réaction sont exprimées

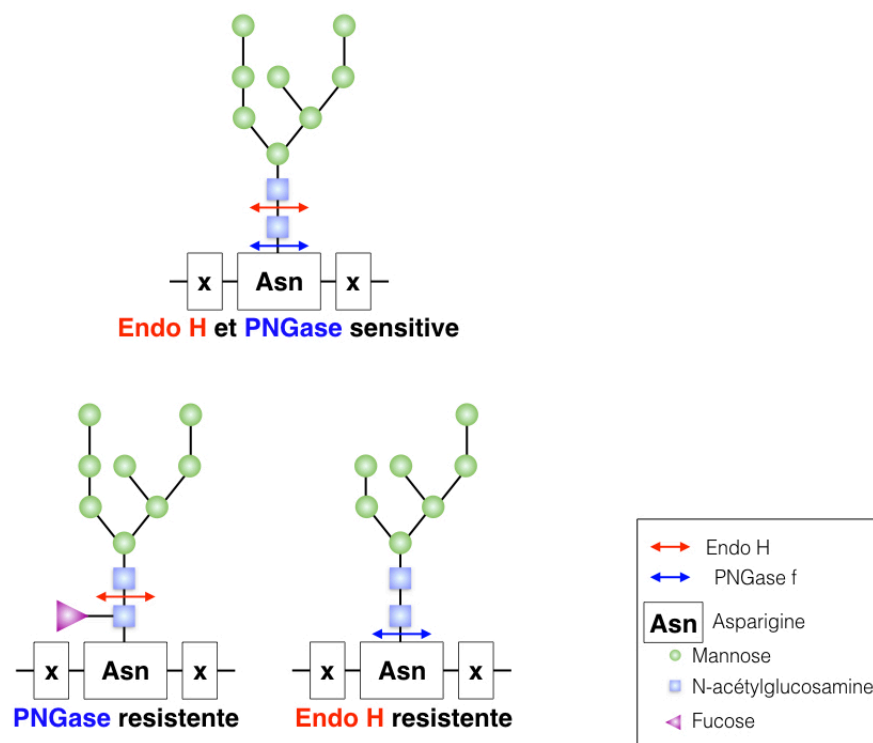


FIGURE 10.1 – Conséquences de la fucosylation sur la digestion de la N-glycosylation par la PNGase F.

chez les mammifères. De plus, différentes études indépendantes ont mis en évidence la résistance de protéines de mammifères vis à vis de la PNGase F. Ainsi, Geetha Srikrishna et al. montrent, chez le bovin, que certaines protéines présentes dans le poumon ne sont pas sensibles à la PNGase F [486]. En 2016, Villaverde et al. révèlent que la protéine TEX101, présente dans le liquide séminal de rat, n'est pas digérée par la PNGase F alors que cette même protéine, quand elle est prélevée directement dans le testicule du rat, est partiellement digérée par la PNGase F [487]. Le rôle essentiel de cette protéine dans la fécondité les a conduit à émettre l'hypothèse que la résistance de la TEX101 à la PNGase F consiste en un mécanisme de défense et permet de protéger cette protéine de l'action des glycosydases pendant la maturation épидидymale. Dans notre étude, l'apparition de la résistance à la PNGase F, à J16, s'associe à une diminution de la stabilité de PCSK9. Ainsi, dans notre contexte la possible modification du groupement glycosylé induisant la résistance à la PNGase F ne permet pas d'augmenter la durée de vie de PCSK9.

La présence d'une modification postraductionnelle sur un des acides aminés encadrant l'asparagine en position 533 pourrait expliquer la résistance de la N-glycosylation pour

la PNGase F. À l'heure actuelle, les seules modifications postraductionnelles identifiées sont deux sulfatations sur des tyrosines, une en position 38 et une seconde dans le domaine catalytique, trois phosphorylations sur des sérines en position 47, 668 et 688 et une N-glycosylation sur une asparagine en position 533. En plus des sites de phosphorylation identifiés, un site de phosphorylation potentiel a été révélé, en position 535, par des méthodes de prédiction. La phosphorylation de la sérine, séparée de l'asparagine par un acide aminé, pourrait elle empêcher la PNGase F d'accéder à la N-glycosylation en 533 ? Une différence de phosphorylation a été suggérée par certains de nos résultats. L'expression ainsi que les niveaux protéiques de FAM20c, kinase responsable de la phosphorylation de PCSK9, sont significativement augmentés dans les derniers stades de maturation des Caco-2. La réalisation d'une déglycosylation par la PNGase F à la suite d'une déphosphorylation permettrait de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse. La conformation de PCSK9 pourrait également constituer une barrière à l'action de la PNGase F. La cystéine en position 534 est impliquée dans un pont dissulfure avec une seconde cystéine en position 601. Cependant la méthode de digestion implique une étape de dénaturation à 100°C dans un tampon contenant du SDS. Il est donc peu probable que des ponts dissulfures soient maintenus dans ces conditions.

L'ensemble de ces travaux s'inscrit dans la recherche de nouveaux moyens de lutte contre les maladies cardiovasculaires, dont l'hypercholestérolémie est un facteur de risque. Une meilleure caractérisation des mécanismes impliqués dans les effets hypocholestérolémiantes des chirurgies bariatriques permettrait à terme, de s'affranchir de l'aspect chirurgical et de cibler directement les différents acteurs impliqués dans l'amélioration du profil lipidique après chirurgie. De plus, les preuves récentes de l'existence du TICE chez l'homme pourraient favoriser le développement de thérapeutique ciblant la voie transintestinale chez des patients hypercholestérolémiques. Enfin, la découverte des acteurs moléculaires nécessaires à la sécrétion de PCSK9 est essentielle et pourrait permettre le développement de thérapies ciblant la sécrétion hépatique de PCSK9.

Annexes

Techniques of Sleeve Gastrectomy and Modified Roux-en-Y Gastric Bypass in Mice

Video Article

Techniques of Sleeve Gastrectomy and Modified Roux-en-Y Gastric Bypass in Mice

Audrey Ayer¹, Frederic Borel¹, Francois Moreau¹, Xavier Prieur¹, Michel Neunlist², Bertrand Cariou³, Claire Blanchard^{*1,4}, Cedric Le May^{*1}¹Institut du Thorax, INSERM, CNRS, UNIV Nantes²CHU Nantes, Institut des Maladies de l'Appareil Digestif, INSERM U913³Institut du Thorax, INSERM, CNRS, UNIV Nantes, CHU Nantes⁴Service de Clinique Chirurgicale Digestive et Endocrinienne, CHU de Nantes

*These authors contributed equally

Correspondence to: Cedric Le May at cedric.lemay@univ-nantes.frURL: <https://www.jove.com/video/54905>DOI: [doi:10.3791/54905](https://doi.org/10.3791/54905)

Keywords: Medicine, Issue 121, Bariatric surgery, sleeve gastrectomy, Roux-en-Y gastric bypass, obesity, mouse

Date Published: 3/20/2017

Citation: Ayer, A., Borel, F., Moreau, F., Prieur, X., Neunlist, M., Cariou, B., Blanchard, C., Le May, C. Techniques of Sleeve Gastrectomy and Modified Roux-en-Y Gastric Bypass in Mice. *J. Vis. Exp.* (121), e54905, doi:10.3791/54905 (2017).

Abstract

Obesity is a major public health issue, with a prevalence of 4 to 28% for men and 6.2 to 36.5% for women in Europe (from 2003 to 2008). Morbid obesity is frequently associated with metabolic complications, such as type 2 diabetes, hypertension, and dyslipidemia, reducing life expectancy and quality. In the absence of any effective noninvasive treatments, bariatric surgery is a valuable therapeutic option for patients with morbid obesity (body mass index (BMI) >40 kg/m²), leading to long-term, sustained weight loss and improvements in metabolic complications. However, the underlying cellular and molecular mechanisms sustaining the beneficial effects of bariatric surgery are not yet fully understood. Due to the numerous genetically-modified strains available, the mouse model is the most convenient animal model to explore the molecular mechanisms behind the pleiotropic beneficial effects of bariatric surgeries. Here, we detailed the optimized healthcare methods and surgical protocols in mice for the two most widely-used bariatric surgeries: the sleeve gastrectomy and the modified Roux-en-Y gastric bypass. Deciphering the molecular mechanisms underlying the therapeutic effects of bariatric surgeries offers the promise of identifying new therapeutics targets.

Video Link

The video component of this article can be found at <https://www.jove.com/video/54905/>

Introduction

The worldwide pandemic of obesity and diabetes is devastating in severity. Over two billion adults worldwide (30% of the population) are either overweight (BMI >25 kg/m²) or obese (BMI >30 kg/m²)¹. This can come along with metabolic complications, such as type 2 diabetes, hypertension, and dyslipidemia, leading to increased morbidity and mortality. Obesity increases the overall mortality and the prevalence of cancer². Due to the lack of any effective noninvasive treatments, bariatric surgery represents the only option that can lead to long-term, sustained weight loss^{3,4}. A number of different surgical methods have been developed, but the sleeve gastrectomy (SG) and Roux-en-Y gastric bypass (RYGB) are the two procedures most commonly used in clinical practice. During the SG procedure, 80% of the initial volume of the stomach is removed; thus, this technique is one of the restrictive surgeries that improves satiety. The RYGB is one of the restrictive-malabsorptive techniques. During RYGB, a small gastric pouch (1-2% of the total gastric volume) is created and the intestine is rearranged into a Y-shape, which delays digestion and the absorption of nutrients. These two techniques lead to significant body weight reductions and general improvements in frequently-associated comorbidities (e.g., hypertension, type 2 diabetes, and dyslipidemia)³, with a higher efficiency seen in RYGB. However, the molecular mechanisms behind the pleiotropic beneficial effects of the bariatric surgeries are often not fully elucidated. Due to the numerous genetically-modified strains available, a mouse model is the most convenient animal model to explore these molecular mechanisms.

However, bariatric procedures are difficult to directly adapt to small animal models and require high surgical dexterity. While SG can be easily performed in rodents with a very good survival rate, RYGB is lethal in mice due to severe bowel obstructions⁵. Different modified RYGB techniques have been proposed to counteract this problem, notably the oesojejunosomy⁶. Here, we present another alternative: the gastrojejunostomy without a stomach excision. This modified RYGB reproduces most of the beneficial effects observed in humans (*i.e.*, a significant body weight reduction and an improvement in glucose and lipid homeostasis).

This manuscript aims to summarize and discuss the technical and experimental details of SG and RYGB in mice and to facilitate these procedures with the help of videos. A specific highlight will be made regarding the optimization of the preoperative and postoperative healthcare protocols that allow the reduction of vitamin and iron deficiencies.

Protocol

Animal and housing: Obtain 8-week-old C57Bl/6 male mice. At 10 weeks old, give the C57Bl/6 mice free access to water and a high-fat diet (DIO diet: 35% kcal from fat, 25.8% caseine, 1.30% mineral AIN, 1.30% vitamins, 1.70% dicalcium phosphate, 0.7% calcium carbonate, 2.10% citrate potassium, 0.026% choline bitartrate, 8.9% sucrose, 0.384% cystine, 6.5% cellulose, 31.7% lard, 3.3% soybean oil, and 16.29% maltodextrine) for 8 (SG) or 14 (RYGB) weeks prior to the bariatric surgeries. To promote weight gain, give the mice dedicated to the RYGB surgery (sham & RYGB) water containing 20% fructose (w/v) in addition to the high-fat diet.

Ethics Statement: All protocol steps described below follow the guidelines of the Ethics Committee for Animal Experimentation of Pays de la Loire under the approval number 01953.01.

1. General Preoperative Preparation

1. Fast the mice for 6 h before the surgery. Gel diet food was given 3 days before surgery and exclusively one day before surgery. Induce anesthesia in a chamber with 5% isoflurane (0.4 L/min) and O₂ (dioxygen; 0.4 L/min). Perform a toe-pinch test to confirm that the anesthetization is effective. Administer analgesics (0.1 mg/kg buprenorphine), antibiotics (10 mg/kg marbofloxacin), and pro-kinetics (1 mg/kg metoclopramide) *via* subcutaneous injections.
2. Allocate a specific work area for surgical procedures (distant from laboratory traffic and ventilation fans). Clean the surgical area with dedicated hard surface disinfectants. Place a heating pad on the working space area to maintain mouse homeothermy during the surgery. Apply a clean, absorbent underpad over the heating pad.
3. Shave the abdomen from sternum to pelvis using an electric razor. Wrap the mouse abdomen in sterilized plastic wrap (**Figures 1A and 2A**) and place the mouse in supine position on the heating pad.
4. Apply vet ointment on the eyes to prevent dryness while under anesthesia. Place the mouse in the nose cone and maintain anesthesia with 2% isoflurane (0.4 L/min) and O₂ (0.4 L/min).
5. Before beginning the surgery, put on a sterile examination gown, a disposable scrubs cap, a facemask, and sterile gloves. Open an autoclaved package containing a sterilized surgical instrument set, which is required for all steps of the surgery. Cut a window in the sterilized plastic wrap and disinfect the skin with 2 successive povidone-iodine solutions.

2. Sleeve Gastrectomy: Surgical Procedure

1. **Median laparotomy (Figure 1B)**
 1. Under a binocular microscope and with a scalpel, perform a midline incision from the sternum to the middle of the abdomen to open the abdominal cavity (do not damage the abdominal muscles). Protect the skin with a sterile compress soaked with 37 °C saline solution.
2. **Stomach exposure (Figure 1C)**
 1. Gently mobilize the stomach using moistened-cotton swabs. Free the stomach from its lateral close connective tissue attachments using moistened cotton swabs or micro scissors.
 2. Gently, externalize the stomach fully and place a hemostatic collagen compress behind the stomach. Suture the pylorus and esophagus vessels along the stomach greater curvature with 8.0 non-absorbable sutures to avoid future bleeding (**Figure 1D and E**). Note: Hemostat use can induce tissue damage, make sure to only use it on tissue that aim to be resected.
3. **Resection of the cardiac region of stomach (fundus)**
 1. Perform a gastrotomy on the anatomical line present between the pyloric region (corpus) and the cardiac region of stomach (fundus) (**Figure 1F**).
 2. Remove residual food with 2 moistened cotton swabs towards each side of the stomach. Using micro scissors, cut the stomach along the boundary between the fundus and the corpus of the stomach (**Figure 1G**).
 3. Press a hemostatic collagen compress for 2 min in case of major bleeding. Close the stomach opening with 8.0 non-absorbable sutures from the gastro-oesophageal junction to the end of the incision (**Figure 1H**).
4. **Resection of the pyloric region of stomach (corpus)**
 1. Complete the stomach resection along the greater curvature so as to remove approximately 80% of the stomach (**Figure 1I**). Standardize the width of the SG to 3 mm. Press a hemostatic collagen compress for 2 min in case of major bleeding.
 2. Close the opening of the pyloric region of the stomach with 8.0 non-absorbable suture (**Figure 1J**). Gently roll 2 moistened cotton swabs towards each side of the stomach to ensure that the suture is leak-proof.
 3. Complete with 8.0 non-absorbable sutures in case of leakage. Remove the hemostatic collagen compresses and return the stomach to the abdominal cavity. Leave a hemostatic collagen compress against the suture.
5. **Abdominal closure**
 1. Close the muscle layer of the abdominal wall with 5.0 non-absorbable sutures (**Figure 1K**). Reduce anesthesia by reducing the isoflurane concentration to 1%. Close the skin using 5.0 non-absorbable sutures (**Figure 1L**).

3. Roux-en-Y Gastric Bypass: Surgical Procedure

1. **Median laparotomy**

1. Under a binocular microscope and with a scalpel, perform a midline incision from the sternum to the middle of the abdomen to open the abdominal cavity (do not damage the abdominal muscles). Protect the skin with a sterile compress soaked with 37 °C saline solution (**Figure 2B**).
2. **Biliopancreatic limb and alimentary limb**
 1. Externalize the intestine (**Figure 2C**). Measure 8 cm from the pylorus and perform two ligatures of the intestine with 5.0 non-absorbable sutures (**Figure 2D**).
 2. Cut the intestine between the two ligatures (**Figure 2E**). Place the proximal limb of the two ends in the upper-left quadrant of the abdomen. Note: This will be used as the alimentary limb (**Figure 2F**).
 3. Place the distal limb of the two ends facing the alimentary limb 6 cm below the proximal limb (**Figure 2F**).
NOTE: This will be used as the biliary limb.
3. **Jejuno-jejunostomy**
 1. Cut both the proximal limb and the intestine loop using micro scissors and perform two antimesenteric incisions of the same length (**Figure 2G and 2H**).
 2. Perform side-to-side anastomosis with two 8.0 non-absorbable sutures. Perform the dorsal side anastomosis first (**Figure 2I**), followed by the ventral side anastomosis (**Figure 2J**).
 3. Gently roll 2 moistened cotton swabs towards each side of the anastomosis to ensure that the suture is leak-proof. Complete with 8.0 non-absorbable sutures in case of leakage.
4. **Gastro-jejunostomy**
 1. Gently mobilize the stomach using moistened cotton swabs. Free the stomach from its lateral close connective tissue attachments using moistened cotton swabs or micro scissors.
 2. Gently, externalize the stomach fully, placing a re-absorbable hemostatic collagen compress behind the stomach. Perform a ligature of the pylorus using a 5.0 non-absorbable suture passed through the omentum using curved micro forceps (**Figure 2K and 2L**).
 3. Cut both the ventral side of the stomach, 1.5 cm from the pylorus, and the distal limb using micro scissors, creating two incisions of the same length (**Figure 2M**).
 4. Perform side-to-side anastomosis with two 8.0 non-absorbable sutures. Start with the dorsal side anastomosis (**Figure 2N**), and then perform the ventral side anastomosis (**Figure 2O**). Gently roll 2 moistened-cotton swabs towards each side of the anastomosis to ensure that the suture is leak-proof. Complete with 8.0 non-absorbable sutures in case of leakage.
5. **Abdominal closure**
 1. Close the muscle layer of the abdominal wall using 5.0 non-absorbable sutures (**Figure 2P**). Reduce the anesthesia by reducing the isoflurane concentration to 1%. Close the skin using 5.0 non-absorbable sutures (**Figure 2Q**). Administer 25 mL/kg of warm saline solution via subcutaneous injection.

4. General Postoperative Care

1. Stop isoflurane and continue with an O₂ flow of 0.8 L/min until the mouse is fully awake. Do not leave the mouse unattended until it regains motor control, indicated by the animal starting to move around the cage and being able to stand and walk without falling.
2. Place the mouse (only one mouse per cage) in an incubator under 30 °C temperature condition for 5 days.
3. Maintain iron (0.5 mg/kg/day; subcutaneous injection) and vitamin (800 mg/180 mL in water) supplementations in the RYGB mice until the end of the protocol.
4. Return free access to gel diet food (high-fat gel diet: 10% lard, 10% liquid sugar, 57% water) for 5 days after surgery. Reintroduce a solid diet 3 days after surgery.
5. Subcutaneously inject buprenorphine (0.1 mg/kg, twice daily, from day 0 to day 3 after surgery), meloxicam (1 mg/kg, from day 0 to day 3 after surgery), metoclopramide (1 mg/kg, from day 0 to day 5 after surgery), and marbofloxacin (10 mg/kg, from day 0 to day 3 after surgery).

5. Postoperative Metabolic Parameters Assessment

1. **Food intake measurement**
 1. Allow the mice to recover for 1 week after surgery. House the mice one per cage. Measure the amount of solid diet placed in the cage. Weight the remaining food 24 h later. Repeat this step as long as required.
2. **Oral glucose tolerance test**
 1. Fast the mice for 6 h before the oral bolus. Harvest a blood drop from the tail tip and apply it on a glucose strip inserted in a glucometer to determine the time 0 blood glucose value.
 2. Administer an oral bolus of 20% D-glucose solution (2 g/kg). Measure the blood glucose levels at 15, 30, 60, and 120 min post gavage.
3. **Hemoglobin level analysis**
 1. Using a hematology system, measure 20 µL of fresh blood to sample the hemoglobin level.

6. Euthanasia

1. Anesthetize the mice by intraperitoneally injecting a xylazine/ketamine solution (10/80 mg/kg). Perform a cervical dislocation. Verify complete euthanasia by ensuring that the heart is not beating and the eyeball blink reflex is lost.

Representative Results

General conditions

The mean operative time for the SG procedure was 49.3 ± 1.5 min. We removed 62.8 ± 5.0 mg of stomach, which represents about 80% percent of the stomach. No mice died during the surgery or during the following seven days. One mouse (7.1%) died on the 11th postoperative day because of a gastric obstruction caused by a bezoar.

The mean operative time for the RYGB procedure was 89.1 ± 2.8 min. The mortality rate was significantly higher after RYGB (sham: 25% *versus* RYGB: 66.6%; $p = 0.038$). The main causes of postoperative deaths were anastomotic leaks ($n = 8$), anastomotic stenosis ($n = 5$), anesthesia complications ($n = 4$), and postoperative bleeding ($n = 2$). We also observed two long-term deaths due to gastrointestinal anastomosis stenosis with chronic obstruction and malnutrition. As shown in **Figure 3**, we noticed a progressive improvement of the post-operative survival rate throughout the protocol, indicating that intensive surgical training is required to master the RYGB surgical technique.

Body weight, food intake, and glucose homeostasis

The mice had similar body weights before surgery. SG demonstrated significant weight loss 14 days after surgery compared to sham control mice (sham: -6.6% *versus* SG: -16.0%; $p < 0.01$; **Figure 4A**). RYGB was associated with significant weight loss from postoperative days 14 (sham: -7.9% on day 14 post-surgery and -5.1% on day 28 post-surgery *versus* RYGB: -22.9% on day 14 post-surgery and -25.5% on day 28 post-surgery; **Figure 4B**). The daily food intake was reduced by 35% during the 14-day period following the SG (**Figure 4C**). In contrast, we did not observe such an anorexigenic effect between the sham and RYGB mice (**Figure 4D**). We also reported an improvement of glucose tolerance following SG and RYGB surgeries (**Figure 4E, 4F**).

Beneficial effect of iron supplementation on RYGB-induced anemia

We did not observe a significant decrease of hemoglobinemia 14 days after SG surgery (data not shown). In contrast, severe anemia was measured in RYGB-operated mice, but it did benefit from specific iron supplementation (**Figure 5A**). Daily iron supplementation was indeed crucial and prevented significant anemia 28 days after RYGB surgery (**Figure 5B**).

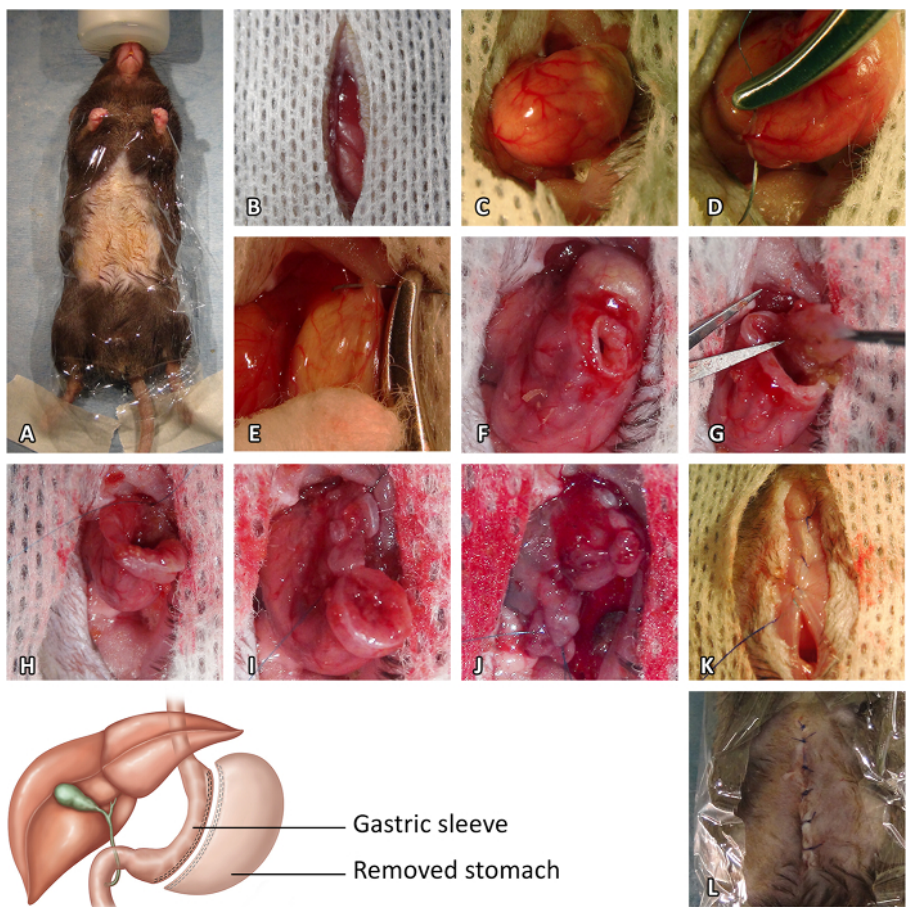


Figure 1: Sleeve Gastrectomy Procedure. (A) Preoperative preparation. (B) Median laparotomy. (C) Stomach exposure. (D) Pylorus vessel suture. (E) Esophagus vessel suture. (F) Initial gastrotomy. (G) Resection of the cardiac region of the stomach. (H) Closure of the stomach opening from the gastroesophageal junction to the end of the incision. (I) Resection of the pyloric region of the stomach. (J) Closure of the opening of the pyloric region. (K) Closure of the muscle layer of the abdominal wall. (L) Closure of the skin. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

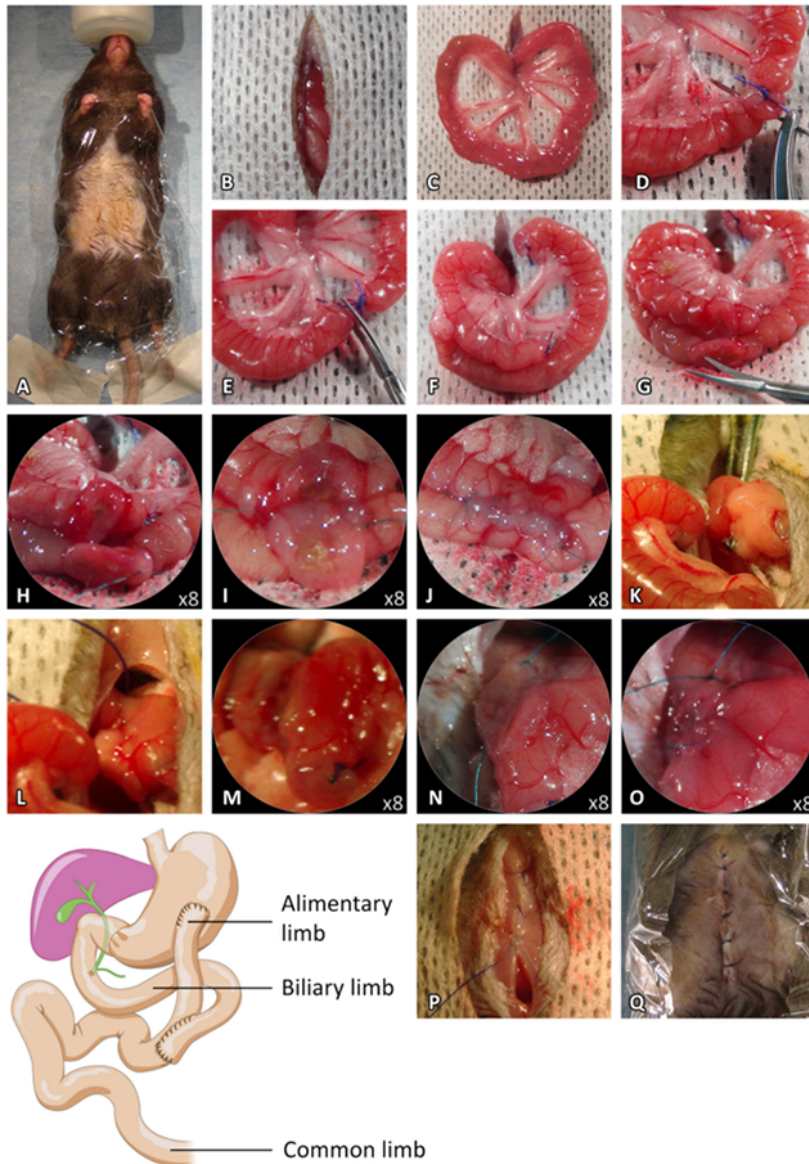


Figure 2: Roux-en-Y bypass Procedure. (A) Preoperative preparation. (B) Median laparotomy. (C) Externalization of the small intestine. (D) Biliopancreatic and alimentary limbs ligatures. (E) Small intestine section between the ligature. (F) Intestinal limb positioning for the jejuno-jejunosomy. (G-H) Antimesenteric incisions of the proximal limb and the intestine loop. (I) Dorsal side-to-side anastomosis. (J) Ventral side-to-side anastomosis. (K-L) Pylorus ligature. (M) Incision of the ventral side of the stomach. (N) Incision of the distal limb and dorsal side-to-side anastomosis. (O) Ventral side-to-side anastomosis. (P) Closure of the muscle layer of the abdominal wall. (Q) Closure of the skin. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

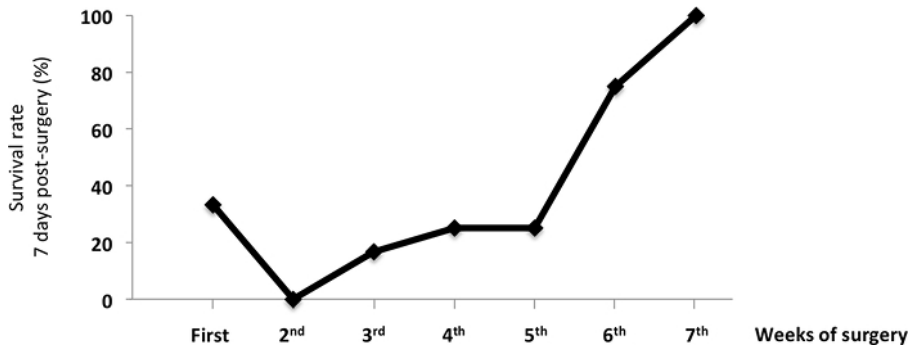


Figure 3: Survival Rate of Mice 7 Days after the RYGB Surgery. The data show the benefit of surgical training on the survival rate of RYGB-operated mice. The values are shown as the mean value \pm SEM. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

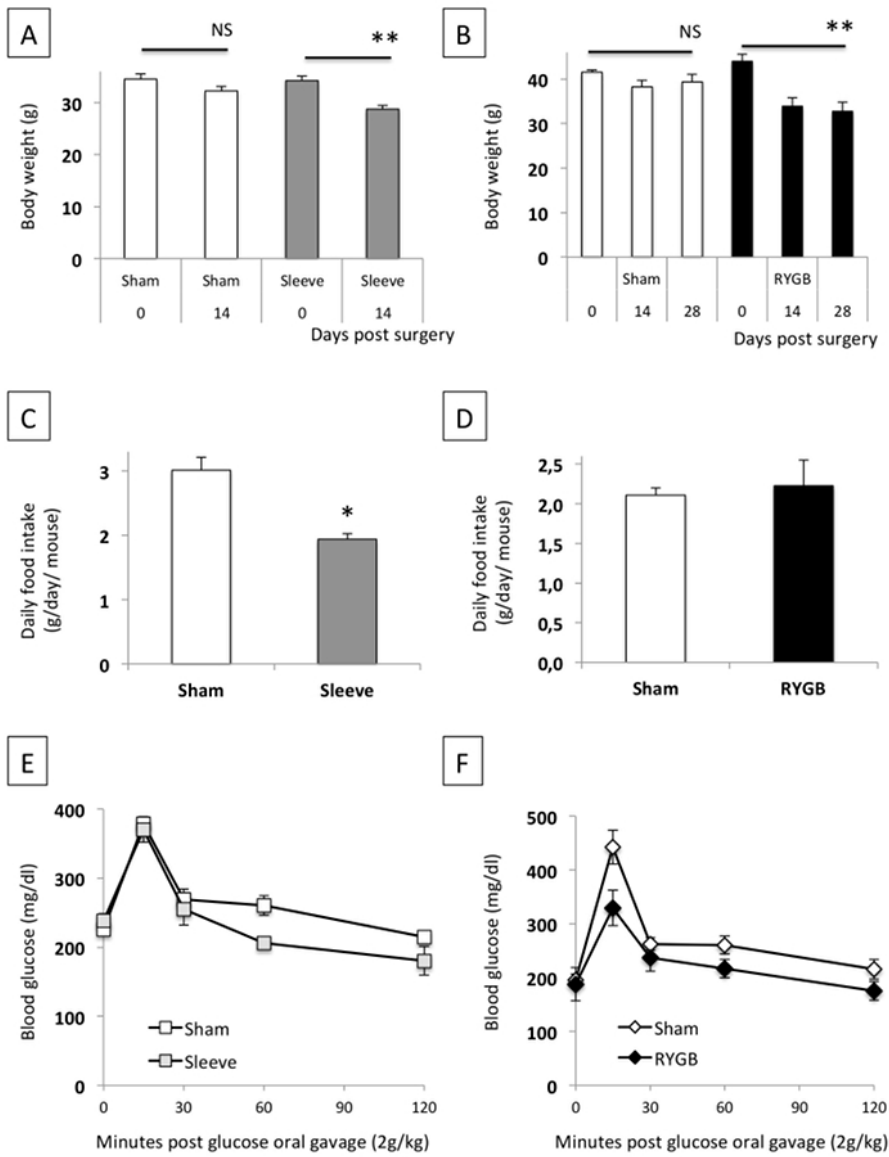


Figure 4: Effect of SG (A, C, D) and RYGB (B, D, F) on Bodyweight, Daily Food Intake, and Glucose Tolerance. The data are shown as the mean value \pm SEM. NS: not significant; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ (Mann-Whitney test, ANOVA test). [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

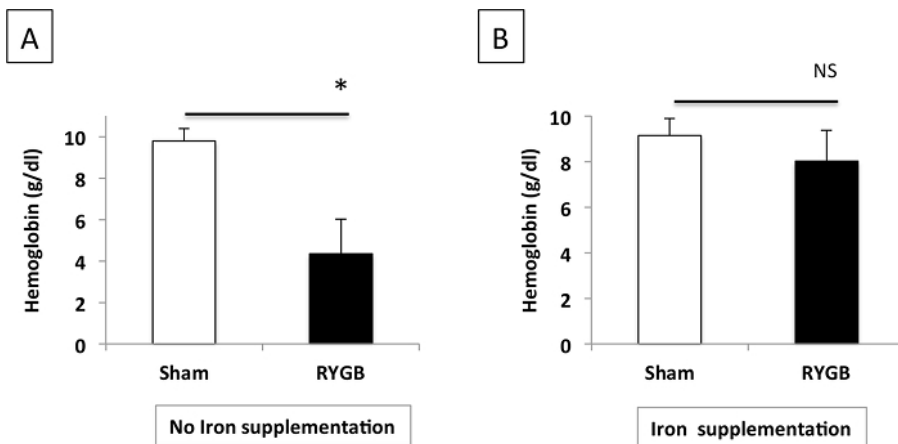


Figure 5: Plasma Hemoglobin Levels after RYGB in Mice Without (A) or With (B) Iron Supplementation. The data are shown as the mean value ± SEM. NS: not significant; * P < 0.05 (Mann-Whitney test). [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

Discussion

To overcome the growing epidemic of obesity, the first bariatric surgery procedures emerged in the 1960s in the United States. Since then, the number of procedures performed worldwide each year still increase, and today, these techniques represent the best therapeutic option for the management of morbid obesity⁶. Among the procedures developed, SG and RYGB are the two most popular methods used in clinical practice⁴. Animal models, notably rodents, have been used to decipher the mechanisms behind the general health improvement observed after bariatric surgery.

To decipher the molecular mechanisms sustaining the beneficial metabolic effects of bariatric surgeries, we developed two mouse models of bariatric surgery: the SG, which is often defined as a restrictive technique, and the RYGB, which is described as a restrictive and malabsorptive surgery. The realization of these mouse bariatric procedures requires experience in microsurgery. These models were developed using a technician specialized in animal surgery and a human visceral surgeon. From experience, surgical training was necessary to reach over 75% survival after RYGB. Mastering SG does not require as much time, and the learning curve is shorter, with mortality at about 95%. By contrast, RYGB is a more complex technique and requires 6 to 8 weeks of training to reach an acceptable postoperative survival rate.

In the literature, there are a variety of rodent bariatric procedures that have been previously described^{7,8,9}. In this SG technique, we removed the cardiac region of the stomach (also called the fundus), not present in humans. The objective was to remove about 80% of the stomach. The pouch size of RYGB models in rats ranges from <5% to >20% of the initial stomach size. Several studies used mouse RYGB models, presenting either a complete preservation of the stomach¹⁰, a small gastric pouch⁵, or a total stomach diversion⁵. In a very comprehensive study, Deng Ping Yin and colleagues have evaluated the different mouse models of RYGB and reported that the murine stomach was not anatomically adapted to the creation of a gastric pouch⁵. For our RYGB procedure, we choose to perform a Roux-en-Y without cutting the stomach. As a limitation, our model did not induce a reduction in food intake, which contrasts what it observed in human models of RYGB.

The survival rate after RYGB operations in rats is rarely mentioned by the authors in the literature, but it seems to reach about 30 to 35% on average¹¹. In our hands, mortality was mainly due to anastomotic leakage or stenosis or to late postoperative gastrojejunal anastomosis stenosis, leading to chronic obstruction with persistent excessive weight loss, which compromised animal welfare. RYGB requires specific perioperative management, including a gel diet during the first three postoperative days and a pain management regime. To improve long-term survival after surgery, we added vitamins postoperatively, particularly fat-soluble vitamins and iron, to prevent anemia. Conversely, mice do not need liposoluble vitamin supplementation after SG, since it was only a restrictive procedure. In the previous papers, the authors did not describe the health condition of operated animals during the postoperative course. Because it is a major surgery, we cannot assume the systematic well-being of the animals in these studies.

In conclusion, mouse models of either restrictive (SG) or restrictive-malabsorptive (RYGB) bariatric surgeries are feasible but require microsurgical training with a learning curve, especially for the RYGB procedure. To keep the animals in good health, perioperative management is very important in the RYGB procedure, particularly in terms of pain, but also in terms of vitamin supplementation. By achieving a faster, sterile surgery and by using microsurgical training, we can greatly improve the postoperative survival rate. These models are useful and essential tools to understand the metabolic effects of bariatric surgery.

Disclosures

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgements

We thank Gilles Mithieux and Aude Barataud (INSERM U1213, Lyon, France) and Marie Liabeuf and Stephanie Lemarchand-Minde (Animal facility, l'Institut du Thorax, Nantes, France) for their help with the animal care protocol. This work was supported by grants from La région des


Pays de la Loire, the Fondation d'Avenir, and the Casden Bank. We would like to thank Catherine Postic, Fadila Benhamed and Michelle Caüzac from l'institut Cochin for their hospitality and their help during the filming process.

References

1. Ng, M., Fleming, T., *et al.* Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet*. **384** (9945), 766-781 (2014).
2. Calle, E. E., Thun, M. J., Petrelli, J. M., Rodriguez, C., & Heath, C. W. Body-mass index and mortality in a prospective cohort of U.S. adults. *The New England Journal of Medicine*. **341** (15), 1097-1105 (1999).
3. Sjöström, L., Lindroos, A.-K., *et al.* Lifestyle, diabetes, and cardiovascular risk factors 10 years after bariatric surgery. *The New England Journal of Medicine*. **351** (26), 2683-2693 (2004).
4. Buchwald, H., Avidor, Y., *et al.* Bariatric surgery: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*. **292** (14), 1724-1737 (2004).
5. Yin, D. P., Gao, Q., *et al.* Assessment of different bariatric surgeries in the treatment of obesity and insulin resistance in mice. *Annals of surgery*. **254** (1), 73-82 (2011).
6. Buchwald, H., & Oien, D. M. Metabolic/Bariatric Surgery Worldwide 2008. *Obesity Surgery*. **19** (12), 1605-1611 (2009).
7. Liu, W., Zassoko, R., *et al.* Establishment of duodenojejunal bypass surgery in mice: A model designed for diabetic research. *Microsurgery*. **28** (3), 197-202 (2008).
8. Lan, Z., Zassoko, R., *et al.* Development of techniques for gastrojejunal bypass surgery in obese mice. *Microsurgery*. (2010).
9. Schlager, A., Khalailieh, A., *et al.* A mouse model for sleeve gastrectomy: Applications for diabetes research. *Microsurgery*. **31** (1), 66-71 (2011).
10. Troy, S., Soty, M., *et al.* Intestinal Gluconeogenesis Is a Key Factor for Early Metabolic Changes after Gastric Bypass but Not after Gastric Lap-Band in Mice. *Cell Metabolism*. **8** (3), 201-211 (2008).
11. Seyfried, F., Lannoo, M., *et al.* Roux-en-Y gastric bypass in mice--surgical technique and characterisation. *Obesity surgery*. **22** (7), 1117-1125 (2012).

12.1 Retrograde cholesterol transport in the human Caco-2/TC7 cell line : a model to study trans-intestinal cholesterol excretion in atherogenic and diabetic dyslipidemia

Retrograde cholesterol transport in the human Caco-2/TC7 cell line: a model to study trans-intestinal cholesterol excretion in atherogenic and diabetic dyslipidemia

Camille Dugardin¹ · Olivier Briand¹ · Véronique Touche¹ · Marleen Schonewille² · François Moreau⁴ · Cédric Le May⁴ · Albert K. Groen^{2,3} · Bart Staels¹  · Sophie Lestavel¹

Received: 9 October 2016 / Accepted: 18 October 2016
© Springer-Verlag Italia 2016

Abstract

Aims The dyslipidemia associated with type 2 diabetes is a major risk factor for the development of atherosclerosis. Trans-intestinal cholesterol excretion (TICE) has recently been shown to contribute, together with the classical hepatobiliary route, to fecal cholesterol excretion and cholesterol homeostasis. The aim of this study was to develop an in vitro cell model to investigate enterocyte-related processes of TICE.

Methods Differentiated Caco-2/TC7 cells were grown on transwells and incubated basolaterally (blood side) with human plasma and apically (luminal side) with lipid micelles. Radioactive and fluorescent cholesterol tracers were used to investigate cholesterol uptake at the basolateral membrane, intracellular distribution and apical excretion.

Results Our results show that cholesterol is taken up at the basolateral membrane, accumulates intracellularly as lipid droplets and undergoes a cholesterol acceptor-facilitated and progressive excretion through the apical membrane of enterocytes. The overall process is abolished at 4 °C, suggesting a biologically active phenomenon. Moreover, this trans-enterocytic retrograde cholesterol transport displays some TICE features like modulation by PCSK9 and an ABCB1 inhibitor. Finally, we highlight the involvement of microtubules in the transport of plasma cholesterol from basolateral to apical pole of enterocytes.

Conclusions The human Caco-2/TC7 cell line appears a good in vitro model to investigate the enterocytic molecular mechanisms of TICE, which may help to identify intestinal molecular targets to enhance reverse cholesterol transport and fight against dyslipidemia.

Managed by Massimo Federici.

Camille Dugardin and Olivier Briand contributed equally to this study.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00592-016-0936-z) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Bart Staels
bart.staels@pasteur-lille.fr

¹ Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1011 - EGID, Univ. Lille, 59000 Lille, France

² University Medical Center Groningen, Department of Pediatrics, University of Groningen, Groningen, The Netherlands

³ Academic Medical Center, Amsterdam, The Netherlands

⁴ INSERM, UMR 1087, CNRS UMR 6291, 44000 Nantes, France

Keywords Lipid · Efflux · Intracellular cholesterol trafficking · Microtubules

Abbreviations

NBD-cholesterol	Nitrobenzoxadiazol-cholesterol
PC	Phosphatidylcholine
PCSK9	Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9
PFA	Paraformaldehyde
TC	Taurocholate
TICE	Trans intestinal cholesterol excretion

Introduction

Elevation of apolipoprotein B (apoB)-containing lipoproteins is a major component of diabetic dyslipidemia [1] leading to cholesterol accumulation in the arterial wall.

Lowering of LDL-cholesterol reduces the risk of cardiovascular diseases [2], especially in type 2 diabetic patients [3]. Enhancing fecal cholesterol excretion might thus be a good approach to prevent atherosclerosis in type 2 diabetic patients.

Until 2007, the hepatobiliary route was considered the sole way for fecal cholesterol excretion. However, the amount of cholesterol entering the small intestine via diet and bile minus the amount of cholesterol that is absorbed in the intestine does not always equal the amount of cholesterol excreted in the feces, suggesting the existence of an alternative pathway [4, 5]. By using an *in situ* intestinal perfusion method in mice, van der Velde et al. [6] demonstrated the direct luminal secretion of plasma-derived cholesterol by enterocytes, identifying this pathway as a contributor to the cholesterol balance. This non-biliary route called trans-intestinal cholesterol excretion (TICE) is estimated to contribute 20–30% of fecal neutral sterol excretion in chow-fed mice [7]. Moreover, TICE can be pharmacologically modulated, for instance by ezetimibe [8] and statins [9, 10] in mice. Using genetically modified mice, TICE was established as a multiorgan process involving cholesterol and lipoprotein metabolism not only in the intestine but also in the liver and the circulation [11]. However, TICE culminates in the proximal part of the small intestine [6], in which the rate-limiting steps of the overall process are thought to occur. Especially, TICE relies mainly on apoB-containing lipoprotein uptake at the basolateral membrane of enterocytes, and luminal excretion through the apical transporters ABCG5/G8 [12–14] and ABCB1 [9]. TICE is, moreover, facilitated by the presence of cholesterol acceptors composed of phospholipids and/or bile salts in the intestinal lumen [6]. At present, the molecular mechanisms behind the trans-enterocytic process of TICE are still unknown, especially the steps sustaining cholesterol entry, trafficking and efflux in enterocytes. Moreover, except intestinal explants mounted in Ussing chambers [9], there are no *ex vivo* nor *in vitro* models allowing the study of the contribution of the intestine to the control of the overall TICE pathway.

Polarized human enterocytic Caco-2/TC7 cells are largely used as a model to study intestinal epithelial transport, lipid absorption and lipoprotein synthesis [15–19]. When differentiated on transwells, Caco-2/TC7 cells spontaneously form an intestinal epithelial monolayer delineating two distinct compartments: An apical compartment mimicking the intestinal lumen and a basolateral compartment representing the lymph/blood circulation. In the present study, we aimed to characterize the Caco-2/TC7 cell line as a model to study the enterocyte-related processes of TICE. We show that upon basolateral incubation with human plasma and apical incubation with lipid micelles, differentiated Caco-2/TC7 cells mimic some of the *in vivo* TICE

features. Using this *in vitro* model, we identify a key role of microtubules in the process.

Materials and methods

Caco-2/TC7 cell culture

Caco-2/TC7 cells (from Pr. Rousset, INSERM UMR 872, Paris, France) were cultured and grown on microporous polyethylene terephthalate (PET) membrane insert transwells (BD Falcon) as previously described [17]. All experiments were performed 21 days after seeding. The epithelial barrier integrity was checked by Lucifer Yellow permeability test (supplemental Materials and Methods).

When indicated, Caco-2/TC7 cells were pre-incubated for 24 h with recombinant human proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (rPCSK9) protein 2.5 µg/mL (AcroBiosystems, PC9-H5223) in the basolateral compartment. The treatment was renewed during the 6-h incubation period of the “*in vitro* TICE” experiments.

When indicated, Caco-2/TC7 cells were incubated with PSC-833 10 µM (Sigma, SML0572), colchicine 2.5 µM (Sigma, C9754) and nocodazole 5 µM (Sigma, M1404) in the apical and basolateral compartments, during the 6-h incubation period of the “*in vitro* TICE” experiments.

Cholesterol acceptor mixture preparation

Phospholipid/bile salt micelles containing 2 mM phosphatidylcholine (PC)/10 mM taurocholate (TC) were prepared as described [6]. For more details, see supplemental Materials and Methods.

Measurement of the mass of apical-excreted cholesterol

Differentiated Caco-2/TC7 cells grown on transwells were incubated for 6 h at 37 °C with 2.5 mL DMEM containing human plasma (1/40; vol/vol) in the basolateral compartment and 1.5 mL of the indicated phospholipid/bile salt micelles in the apical compartment. Apical media were then recovered and centrifuged (1,000 rpm—5 min). After Folch lipid extraction, cholesterol mass was determined by gas chromatography–mass spectrometry.

Incorporation of a cholesterol tracer in human plasma

Human plasma (total cholesterol: 230 ± 42 mg/dL (Biomérieux enzymatic test)) was obtained from non-fasting healthy donors (French Blood Service) and labeled either with [³H]-cholesterol (42 µCi per mg of plasma

cholesterol) or nitrobenzoxadiazol-cholesterol (NBD-c-cholesterol) (1.6 mg per mg of plasma cholesterol). For more details, see supplemental Materials and Methods.

Measurement of cellular content and apical excretion of plasma-derived cholesterol

Differentiated Caco-2/TC7 cells grown on transwells were incubated for 6 h at 37 °C with 2.5 mL DMEM containing [³H]-cholesterol-labeled plasma (1/40; vol/vol) in the basolateral compartment and 1.5 mL of the indicated phospholipid/bile salt micelles in the apical compartment. Apical media were sampled (85 µL) at different time points and centrifuged (1,000 rpm—5 min). At the end of the experiment, cells were washed with ice-cold PBS then harvested in 1 mL Solvable (PerkinElmer). Radioactivity was counted using the TopCount NXT v2.13 (Perkin Elmer). Protein content in cell homogenates was determined according to the Lowry method modified by Peterson [20].

Statistical analysis

Data are reported as mean ± SD, and statistical significance was established at $p < 0.05$. Student's *t* test and nonparametric variance analysis followed by multiple comparisons were performed as appropriate (Graphpad Prism).

Results

Basolateral uptake and apical excretion of plasma-derived cholesterol by differentiated Caco-2/TC7 cells are biologically active processes

To determine whether polarized human enterocytic Caco-2/TC7 cells can perform a retrograde (i.e., basolateral to apical) transport of plasma-derived cholesterol, differentiated cells grown on transwells were incubated with diluted human plasma (1:40) in the basolateral medium for 6 h, corresponding to ~100 µg cholesterol input in the basolateral compartment. As cholesterol acceptors in the luminal side of enterocytes have been reported to facilitate TICE [6], phosphatidylcholine (PC)/taurocholate (TC) (2 mM/10 mM) micelles were added in the apical compartment. At the end of the incubation period, mass spectrometry analysis performed on apical medium measured $\sim 12.7 \pm 4$ µg cholesterol in the apical compartment.

To evaluate whether this cholesterol derives from the cells or from a retrograde transport from the basolateral to the apical side of enterocytes, [³H]-cholesterol was added to the plasma in the basolateral medium as a tracer. The

radioactivity counted in the apical medium at 2, 4 and 6 h of incubation revealed a continuous excretion of plasma-derived cholesterol through the cellular monolayer (Fig. 1a). Performing the experiment at 4 °C (Fig. 1a) led to a severe decrease in plasma-derived cholesterol content in the apical medium, suggesting that this trans-enterocytic retrograde transport of plasma-derived cholesterol may rely on a biologically active process.

After a 6-h incubation period, radioactivity counts in the cells were normalized to cellular proteins. ~1% of the [³H]-cholesterol provided at the basolateral compartment was found associated with the cell homogenates. Performing the same experiment once more at 4 °C resulted in a drastic decrease in the plasma-derived cholesterol content in cell homogenates (Fig. 1b).

To assess the directional specific feature of this trans-cellular transport, the experiment was also performed in the opposite direction, i.e., [³H]-cholesterol-labeled plasma in the apical compartment and PC/TC (2 mM/10 mM) micelles in the basolateral compartment. In both cases, radioactivity counts into the receiving compartment (containing PC/TC micelles) were normalized to cell-associated radioactivity, thus representing plasma-derived cholesterol efflux efficiency. Comparison of plasma-derived cholesterol efflux efficiency in both experimental setups revealed a more efficient cholesterol efflux in the retrograde (i.e., basolateral to apical) direction in Caco-2/TC7 cells (Fig. 1c).

Trans-enterocytic retrograde cholesterol transport in differentiated Caco-2/TC7 cells mimics some in vivo enterocyte-related features of TICE

To investigate the relevance of the trans-enterocytic retrograde cholesterol transport in the Caco-2/TC7 cell line to the intestinal cholesterol pathway sustaining TICE, we next challenged this in vitro model with physiological and pharmacological TICE modulators reported in the literature.

PCSK9 was reported to modulate the trans-intestinal excretion of blood-derived cholesterol in murine models [9]. Incubation of Caco-2/TC7 cells with recombinant human PCSK9 (rPCSK9) resulted in a 20% decrease in the LDLR protein in whole cell homogenates (Fig. 2a), as previously reported [21]. rPCSK9 pre-treated cells were then incubated at 37 °C for 6 h with [³H]-cholesterol-labeled plasma in the basolateral compartment and PC/TC (2 mM/10 mM) micelles in the apical compartment. Compared to untreated cells, rPCSK9 pre-treated cells displayed a significant 28% decrease in plasma-derived cholesterol excretion through the apical membrane (Fig. 2b) and a 17% decrease in plasma-derived cholesterol content in cell homogenates (Fig. 2c). These data reveal

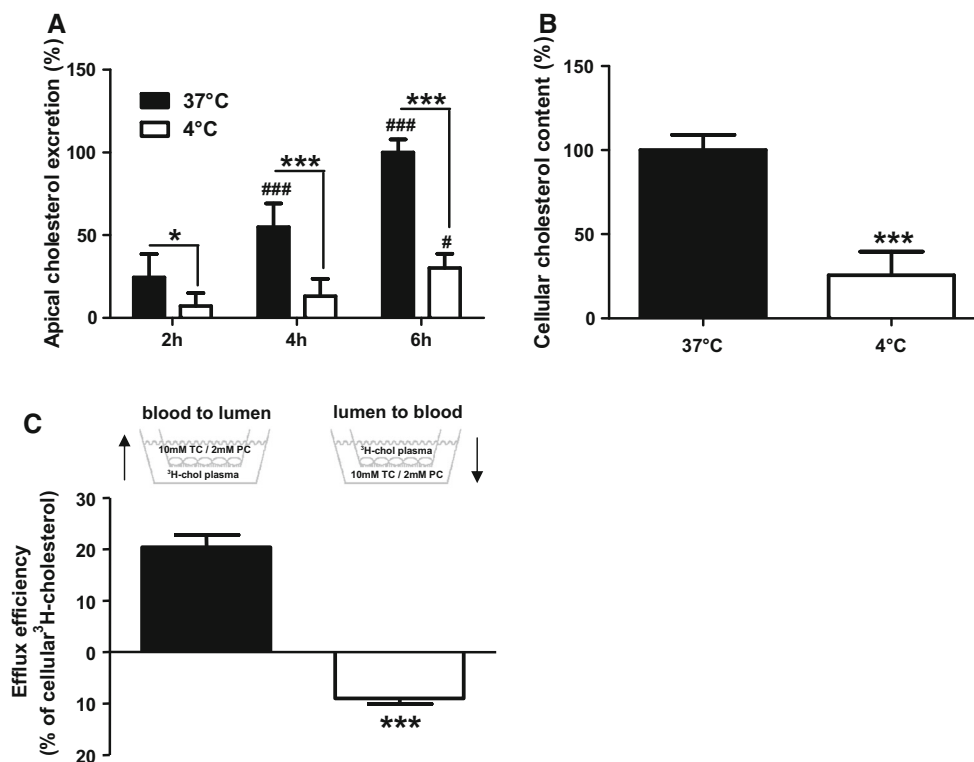


Fig. 1 Trans-enterocytic retrograde cholesterol transport in differentiated Caco-2/TC7 cells is an active process. Differentiated Caco-2/TC7 cells grown on transwells were incubated at 37 °C with [³H]-cholesterol-labeled human plasma in the basolateral compartment and with 2 mM PC/10 mM TC micelles in the apical compartment. Media were sampled in apical compartment at the indicated incubation times and cells were harvested at 6 h. **a**, **b** Effect of incubation temperature on [³H]-cholesterol content in apical media (**a**) and in cell homogenates (**b**). Radioactivity counts were normalized to cellular protein content and expressed as percent of the 2 mM PC/10 mM TC condition at 6 h. Data are mean ± SD from at least two independent experiments in triplicate. **p* < 0.05; ****p* < 0.001 in comparison

with 37 °C. #*p* < 0.05; ###*p* < 0.001 in comparison with previous time point in panel **a** (Two-way ANOVA, Bonferroni posttest (**a**), *t* test (**b**)). **c** Differentiated Caco-2/TC7 cells grown on transwells were incubated at 37 °C for 6 h with [³H]-cholesterol-labeled human plasma either in the basolateral compartment (“blood to lumen”) or in the apical compartment (“lumen to blood”) and with 2 mM PC/10 mM TC micelles in the opposite compartment (receiving compartment). Media were sampled and cells harvested. Efflux efficiency corresponds to the [³H]-cholesterol content in the receiving compartment expressed as % of [³H]-cholesterol content in cell homogenates. Data are mean ± SD from at least two independent experiments in triplicate (*t* test, ****p* < 0.001)

that the retrograde transport of plasma-derived cholesterol in Caco-2/TC7 cells is modulated by rPCSK9 treatment.

Since intestinal ABCB1 on the brush border membrane is reported to be involved in the luminal excretion of blood-derived cholesterol in the TICE process [9], we tested the effect of the ABCB1 inhibitor PSC-833 on the trans-enterocytic retrograde cholesterol transport in Caco-2/TC7 cells. PSC-833 treatment significantly decreased (−20%) plasma-derived cholesterol excretion through the apical membrane (Fig. 2d), without modifying the [³H]-cholesterol content in cell homogenates (Fig. 2e), supporting a role of ABCB1 in plasma-derived cholesterol retrograde transport in Caco-2/TC7 cells.

We conclude that Caco-2/TC7 differentiated cells mimic crucial enterocyte-related features of TICE reported in vivo in mice, i.e., modulation by PCSK9 at the basolateral side and involvement of ABCB1 on the brush border membrane. It may thus serve as a suitable in vitro model to

study enterocyte-regulation of TICE and to decipher specific signaling pathways potentially controlling the intracellular trafficking of cholesterol in enterocytes.

Mobilization of plasma-derived cholesterol to subapical compartments and its apical excretion are stimulated by apical exposure to PC/TC micelles

Since luminal cholesterol acceptors composed of phospholipids and bile salts were reported to facilitate TICE in intestinal perfusion studies [6], we studied the influence of the apical medium composition on the basolateral uptake and apical excretion of plasma-derived cholesterol in this in vitro model. Differentiated Caco-2/TC7 cells were incubated with [³H]-cholesterol-labeled plasma in the basolateral compartment and varying apical medium contents. Compared to DMEM in the apical compartment, incubation with PC/TC (2 mM/10 mM) micelles led to a

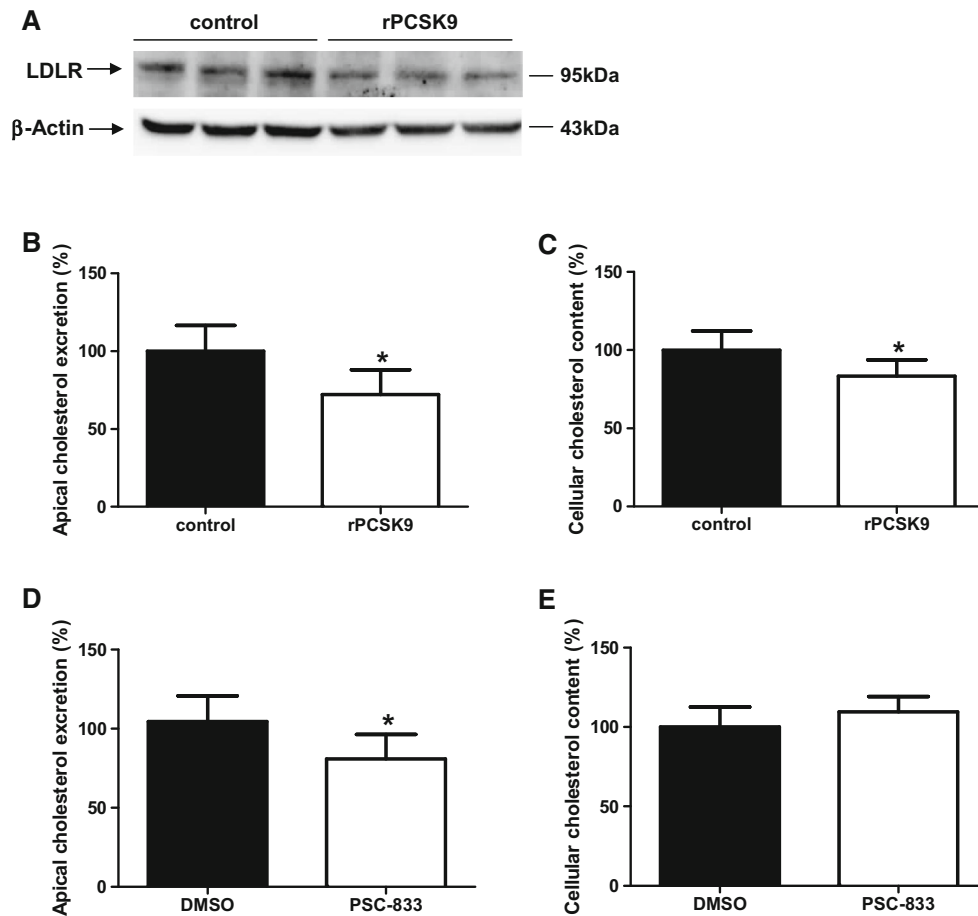


Fig. 2 Trans-enterocytic retrograde cholesterol transport in differentiated Caco-2/TC7 cells mimics some enterocyte-related features of TICE in vivo. **a–c** Differentiated Caco-2/TC7 cells grown on transwells were pre-incubated for 24 h at 37 °C with or without addition of human recombinant PCSK9 (2.5 μ g/mL) in the basolateral compartment. Subsequently, cells were incubated for 6 h with [3 H]-cholesterol-labeled human plasma in the basolateral compartment and 2 mM PC/10 mM TC micelles in the apical compartment. **a** Representative western blot of LDLR (LP02, Oncogene) and β -Actin (SC-1616, Santa Cruz) in whole cell homogenates prepared at the end of the pre-incubation period. **b, c** Effect of rPCSK9 on the [3 H]-

cholesterol content in apical media (**b**) and in cell homogenates (**c**). Radioactivity counts were normalized to cellular protein content and expressed as percent of the control condition. Data are mean \pm SD from at least two independent experiments in triplicate (*t* test, $*p < 0.05$). **d, e** PSC-833 (10 μ M) was added to the media during the 6-h incubation period. Effect on [3 H]-cholesterol content in apical media (**d**) and in cell homogenates (**e**). Radioactivity counts were normalized to cellular protein content and expressed as percent of the DMSO condition at 6 h. Data are mean \pm SD from at least two independent experiments in triplicate (*t* test, $*p < 0.05$)

2.6-fold increase in the plasma-derived cholesterol excretion through the apical membrane (Fig. 3a). However, incubation with PC/TC (0.2 mM/10 mM) mixture, consisting of mainly vesicles and TC monomers instead of micelles [22], was less efficient (1.8 fold compared to 2.6 fold with PC/TC (2 mM/10 mM)) (Fig. 3a). By contrast, adding HDL in the apical compartment did not modify plasma-derived [3 H]-cholesterol content in the apical medium, compared to DMEM (Fig. 3a). Conversely, regardless of apical medium composition, the plasma-derived [3 H]-cholesterol content in cell homogenates remained unchanged (Fig. 3b). These data suggest that the presence of lipid micelles composed of a defined mixture of phospholipids and bile salts (PC/TC (2 mM/10 mM)) in

the apical medium facilitates plasma-derived cholesterol excretion through the apical membrane in Caco-2/TC7 cells, thus again resembling TICE in vivo [6].

To visualize the retrograde transport of cholesterol, [3 H]-cholesterol was substituted by fluorescent cholesterol (NBD-cholesterol). Cells were PFA-fixed after a 6-h incubation period in the previously described conditions, followed by confocal microscopy analysis. The basolateral uptake of plasma-derived cholesterol in Caco-2/TC7 cells was confirmed by the presence of fluorescent lipid droplets inside the cells (Fig. 3c). Compared to other apical medium contents, PC/TC (2 mM/10 mM) micelles led to less accumulation of fluorescent lipid droplets at the basolateral side of enterocytes (Fig. 3c) and a larger intracellular

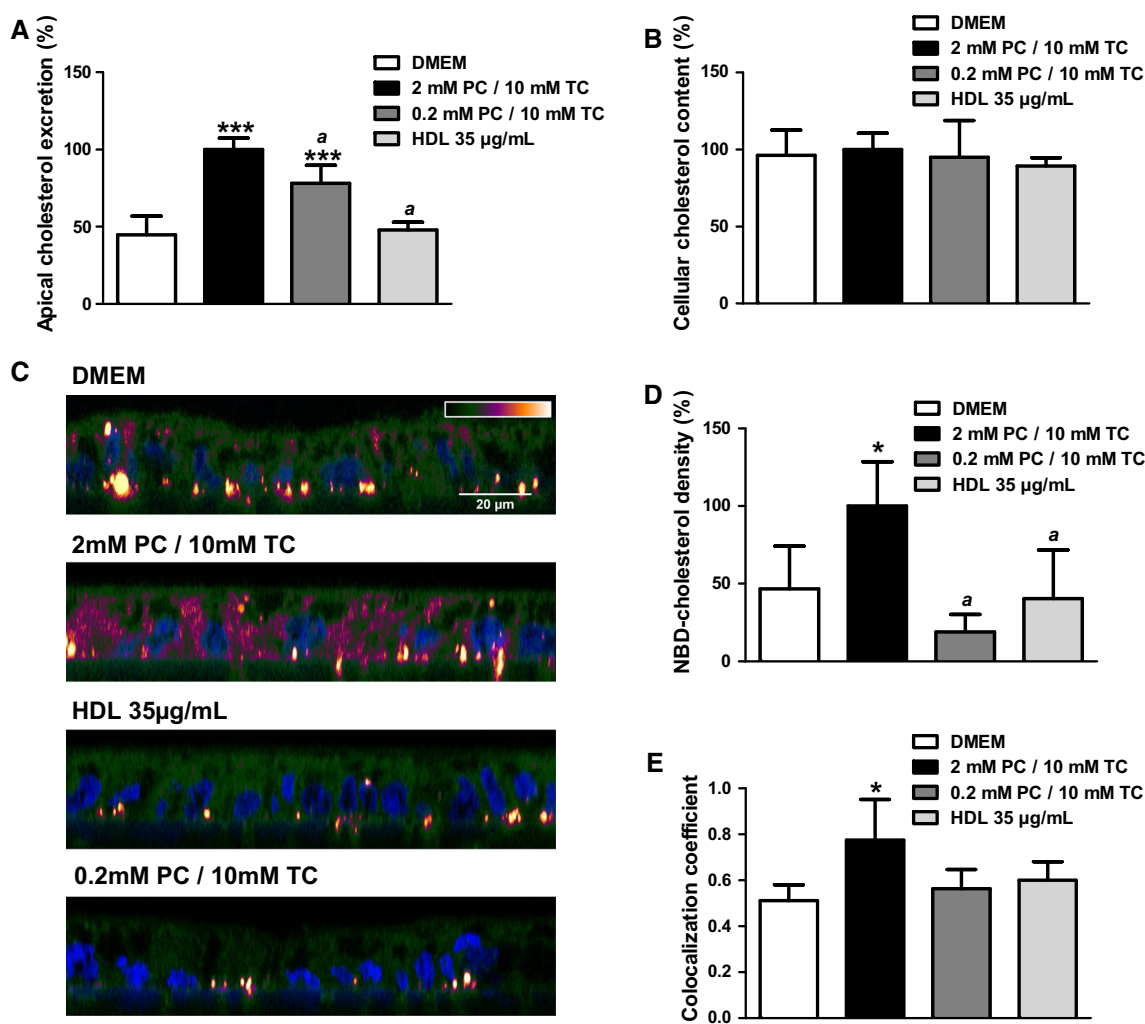


Fig. 3 Mobilization of plasma-derived cholesterol to subapical compartments and its apical excretion are stimulated by apical exposure to PC/TC micelles. Differentiated Caco-2/TC7 cells grown on transwells were incubated at 37 °C with diluted human plasma labeled either with [³H]-cholesterol or NBD-cholesterol in the basolateral compartment and either with DMEM, 2 mM PC/10 mM TC micelles, 0.2 mM PC/10 mM TC mixture or HDL 35 µg/mL in the apical compartment. Media were sampled in apical compartment, and cells were either PFA-fixed or harvested at 6 h. **a**, **b** Effect of apical media composition on [³H]-cholesterol content in apical media (**a**) and in cell homogenates (**b**). 2 mM PC/10 mM TC condition was set at 100%. Data are mean ± SD from at least two independent

distribution of plasma-derived NBD-cholesterol (Fig. 3c, d). These data suggest that the presence of PC/TC micelles in the apical medium as cholesterol acceptors stimulates the intracellular trafficking of cholesterol from the basolateral to the apical pole of enterocytes. Moreover, there is an increased colocalization between plasma-derived NBD-cholesterol and the early endosome marker EEA1 (Fig. 3e), thus highlighting early endosomes as transit compartments of the trans-enterocytic retrograde route for cholesterol in the human Caco-2/TC7 cell line.

experiments in triplicate. **c**, **d** Effect of apical media composition on NBD-cholesterol subcellular distribution. **c** Pseudo-colored transversal confocal views for NBD-cholesterol staining. Nuclei are stained in blue (Hoechst). **d** NBD-cholesterol subcellular distribution assessed by integrated density and expressed as percent of the 2 mM PC/10 mM TC condition. **e** Mander's coefficients of colocalization between NBD-cholesterol and EEA1 (BD Transduction Laboratories, ref 610456). Data are mean ± SD from at least two independent experiments. **p* < 0.05; ****p* < 0.001 in comparison with DMEM; ^a*p* < 0.05 in comparison with 10 mM TC/2 mM PC micelles (one-way ANOVA, Bonferroni posttest) (color figure online)

TICE-like trans-enterocytic retrograde cholesterol transport in differentiated Caco-2/TC7 cells involves microtubules

As the microtubule network plays a central role in vesicular trafficking [23], we evaluated its contribution to the trans-enterocytic retrograde cholesterol transport in differentiated Caco-2/TC7 cells. Therefore, colchicine (2.5 µM) and nocodazole (5 µM), inhibitors of microtubule polymerization, were added during the 6-h incubation period with

[³H]-cholesterol-labeled plasma in the basolateral compartment and PC/TC (2 mM/10 mM) micelles in the apical compartment. Colchicine and nocodazole both significantly decreased plasma-derived cholesterol apical excretion (Fig. 4a) and plasma-derived cholesterol content in cell homogenates (Fig. 4b).

To study the contribution of microtubules in the PC/TC micelle-stimulated intracellular trafficking of cholesterol from the basolateral to the apical pole of enterocytes, the [³H]-cholesterol was substituted by NBD-cholesterol and cells were PFA-fixed after a 6-h incubation period, followed by confocal microscopy analysis. Colchicine and nocodazole treatment lowered plasma-derived NBD-cholesterol staining throughout the cells upon PC/TC micelle exposure (Fig. 4c, d), suggesting that microtubule polymerization inhibitors blunt the PC/TC micelle-stimulated intracellular trafficking of cholesterol from the basolateral to the apical pole of enterocytes.

These results highlight a role of microtubule network in the trans-enterocytic retrograde cholesterol transport in differentiated Caco-2/TC7 cells.

Discussion

The TICE pathway is a major non-biliary contributor to fecal neutral sterol excretion and macrophage reverse cholesterol transport in mice [5]. The direct intestinal excretion of plasma-derived cholesterol to the intestinal lumen through enterocytes is the last decisive step in this multiorgan process. TICE occurs mainly in the proximal part of the intestine and is facilitated by the presence of cholesterol acceptors composed of phospholipid and/or bile salt micelles in the intestinal lumen [6]. Compared to the stimulation of the hepatobiliary route, which may promote gallstone formation [24], enhancing fecal cholesterol excretion by the TICE pathway is an attractive approach to prevent atherosclerosis in type 2 diabetic patients [25]. Indeed, several physiological and pharmacological modulators have been experimentally shown to increase TICE in vivo through the use of two distinct methodologies: the in situ intestinal perfusion method [6] and isotopic-assisted determination of the sources of fecal neutral sterols [12]. More recently, Le May et al. [9] have proposed an ex vivo

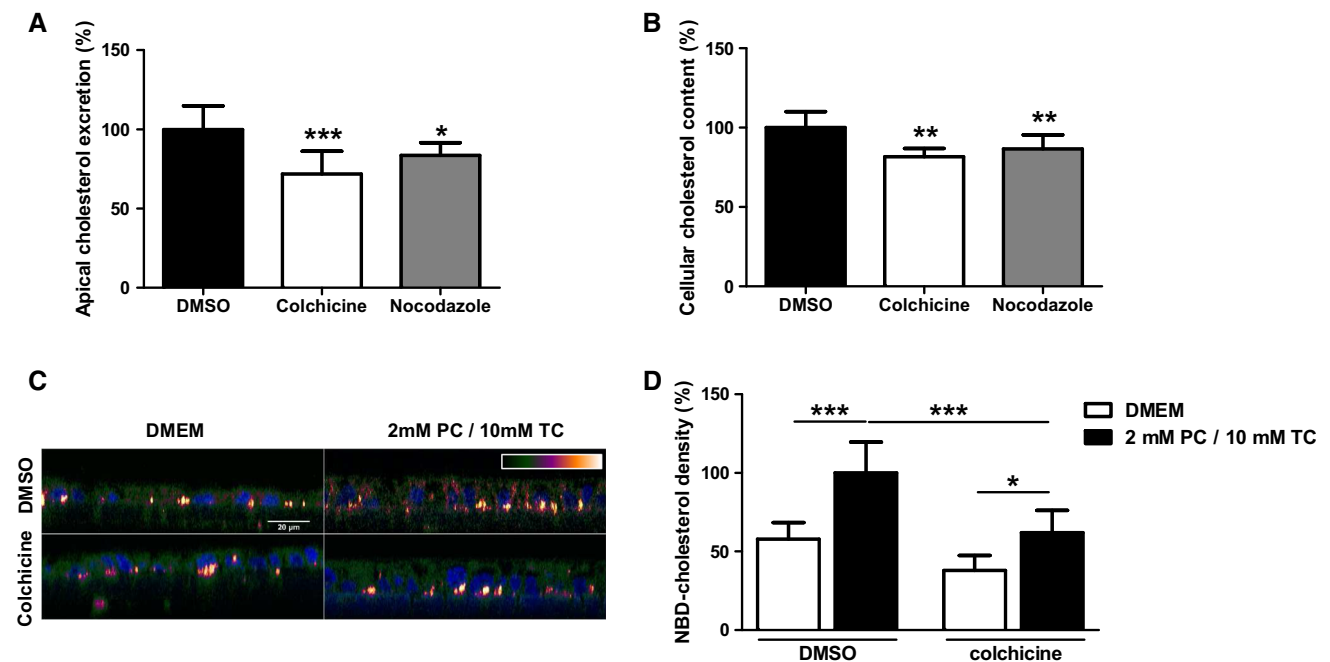


Fig. 4 TICE-like trans-enterocytic retrograde cholesterol transport in differentiated Caco-2/TC7 cells involves microtubules. Differentiated Caco-2/TC7 cells grown on transwells were incubated at 37 °C with diluted human plasma labeled either with [³H]-cholesterol or NBD-cholesterol in the basolateral compartment and 2 mM PC/10 mM TC micelles in the apical compartment. Colchicine (2.5 μM) and nocodazole (5 μM) were added in the media during the 6-h incubation period. Media were sampled in apical compartment, and cells were either PFA-fixed or harvested at 6 h. **a, b** Effect of microtubule polymerization inhibition on [³H]-cholesterol content in apical media (**a**) and in cell homogenates (**b**). Radioactivity counts in apical media were normalized to cellular protein content and expressed as percent

of the DMSO condition. Data are mean ± SD from at least two independent experiments in triplicate (one-way ANOVA, Bonferroni posttest, **p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001). **c, d** Effect of microtubule polymerization inhibition on NBD-cholesterol subcellular distribution in PFA-fixed cells. **c** Pseudo-colored transversal confocal views for NBD-cholesterol staining. Nuclei are stained in blue (Hoechst). **d** NBD-cholesterol subcellular distribution assessed by integrated density and expressed as percent of the 2 mM PC/10 mM TC condition. Data are mean ± SD from at least two independent wells (two-way ANOVA, Bonferroni posttest, **p* < 0.05; ****p* < 0.001) (color figure online)

method based on intestinal explants mounted in Ussing chambers and demonstrated, for the first time, the presence of TICE in the human intestine. Nevertheless, these methods allow neither proper investigation of the direct contribution of the intestine in the overall TICE process nor mechanistic studies on the enterocyte-related processes of TICE, which remain poorly characterized.

In this paper, we demonstrate that the human Caco-2/TC7 cell line may be useful as an *in vitro* model to study enterocyte-related molecular steps of TICE. Indeed, the results of our study show that differentiated Caco-2/TC7 cells take up plasma-derived cholesterol through the basolateral membrane and then excrete it through the apical membrane. This retrograde cholesterol transport is observed at 37 °C and severely blunted at 4 °C, a temperature which leads to a drastic decrease in both the basolateral uptake and the apical excretion of plasma-derived cholesterol, indicating a biologically active process.

Despite low level of ABCG5/G8 ([26] and personal data) which were shown to take part in TICE [12–14], Caco-2/TC7 cells recapitulate some enterocyte-related characteristics of TICE, i.e., modulation by rPCSK9 treatment [9], involvement of ABCB1 [9] and facilitation by the presence of PC/TC micelles at the apical membrane [6].

On the basis of this *in vitro* model, we next investigated enterocyte-related mechanisms of TICE and particularly intracellular cholesterol trafficking which was completely unknown. We have shown by confocal microscopy that PC/TC micelles (2 mM/10 mM) in the apical compartment modify the intracellular distribution of plasma-derived cholesterol, facilitate its transport from sub-basolateral to subapical areas of the enterocyte and increase its colocalization index with early endosomes in subapical areas (EEA1-positive staining). These results suggest the existence of a feedback mechanism initiated by PC/TC micelles and controlling vesicular cholesterol trafficking from basolateral side to early endosomes at the apical side of enterocytes.

It is well established that the microtubule cytoskeleton is important for endocytosis and the endosome–lysosome pathway in polarized epithelial cells [27]. By using colchicine and nocodazole in our *in vitro* model, we found that microtubule disruption blunts both plasma-derived cholesterol subcellular distribution in response to PC/TC micelles and its apical excretion, suggesting the involvement of microtubules in the enterocyte-related processes of TICE. Further studies on the role of microtubules *in vivo* are warranted.

Contrary to the well-known classical endosome–lysosome pathway [23], we could not find any modification of plasma-derived cholesterol excretion at the apical

membrane when Caco-2/TC7 cells were treated with chloroquine, a lysosome inhibitor (data not shown). Some alternative lysosome-independent pathways such as caveolae-mediated endocytosis or transcytosis [28] could thus explain the intracellular route for retrograde cholesterol transport in enterocytes, as shown for LDL uptake in endothelial cells [29].

Although ezetimibe [8] and statins [9, 10] increase TICE *in vivo*, whether anti-diabetic drugs, especially those targeting the intestine like metformin and bile acid sequestrants, modulate TICE has not been studied yet. Combination of studies in the Caco-2/TC7 cell line with studies in mice could allow assessment whether TICE contributes to the cardiovascular protective effect of these anti-diabetic drugs.

In conclusion, this study demonstrates a retrograde transport of plasma-derived cholesterol in the human Caco-2/TC7 cell line mimicking the enterocyte-related part of TICE. It identifies this cell line as a suitable *in vitro* model to investigate, by pharmacological or molecular challenges and cell biology approaches, new molecular pathways sustaining the ultimate steps of TICE in enterocytes. Identification of the molecular mechanisms of TICE pathway may help to identify new molecular targets to induce fecal neutral sterol excretion in order to combat atherogenic dyslipidemia associated with diabetes.

Acknowledgements We thank Beatrice Duthoit for her technical support on cell culture and Meryem Tardivel of the BICeL-IFR114 Facility for access to systems and technical advice. B. Staels is a member of the Institut Universitaire de France. This work was supported by grants from “European Genomic Institute for Diabetes” (E.G.I.D., ANR-10-LABX-46) and European Commission, Fondation Leducq “Transatlantic Networks of Excellence in Cardiovascular Research” (10CVD04). Camille Dugardin Ph.D. was funded 50% Région Hauts de France/50% Université Lille 2.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical standard No ethical standard.

Human and animal rights This article does not contain any studies with human or animal subjects performed by any of the authors.

Informed consent No informed consent.

References

1. Grundy SM (2016) Metabolic syndrome update. *Trends Cardiovasc Med* 26:364–373
2. Baigent C, Blackwell L, Emberson J, Holland LE, Reith C, Bhala N, Peto R, Barnes EH, Keech A, Simes J, Collins R (2010) Efficacy and safety of more intensive lowering of ldl cholesterol:

- a meta-analysis of data from 170,000 participants in 26 randomised trials. *Lancet* 376:1670–1681
3. Szalat A, Durst R, Leitersdorf E (2016) Managing dyslipidaemia in type 2 diabetes mellitus. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 30:431–444
 4. Kruit JK, Plösch T, Havinga R, Boverhof R, Groot PHE, Groen AK, Kuipers F (2005) Increased fecal neutral sterol loss upon liver x receptor activation is independent of biliary sterol secretion in mice. *Gastroenterology* 128:147–156
 5. Temel RE, Sawyer JK, Yu L, Lord C, Degirolamo C, McDaniel A, Marshall S, Wang N, Shah R, Rudel LL, Brown JM (2010) Biliary sterol secretion is not required for macrophage reverse cholesterol transport. *Cell Metab* 12:96–102
 6. van der Velde AE, Vrans CLJ, van den Oever K, Kunne C, Oude Elferink RPJ, Kuipers F, Groen AK (2007) Direct intestinal cholesterol secretion contributes significantly to total fecal neutral sterol excretion in mice. *Gastroenterology* 133:967–975
 7. Brufau G, Groen AK, Kuipers F (2011) Reverse cholesterol transport revisited: contribution of biliary versus intestinal cholesterol excretion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31:1726–1733
 8. Uto-Kondo H, Ayaori M, Sotherden GM, Nakaya K, Sasaki M, Yogo M, Komatsu T, Takiguchi S, Yakushiji E, Ogura M, Nishida T, Endo Y, Ikewaki K (2014) Ezetimibe enhances macrophage reverse cholesterol transport in hamsters: contribution of hepato-biliary pathway. *Biochim Biophys Acta* 1841:1247–1255
 9. Le May C, Berger JM, Lespine A, Pillot B, Prieur X, Letessier E, Hussain MM, Collet X, Cariou B, Costet P (2013) Transintestinal cholesterol excretion is an active metabolic process modulated by psck9 and statin involving abcb1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33:1484–1493
 10. Schonewille M, Freark de Boer J, Mele L, Wolters H, Bloks VW, Wolters JC, Kuivenhoven JA, Tietge UJF, Brufau G, Groen AK (2016) Statins increase hepatic cholesterol synthesis and stimulate fecal cholesterol elimination in mice. *J Lipid Res* 57:1455–1464
 11. Temel RE, Brown JM (2015) A new model of reverse cholesterol transport: enTICEing strategies to stimulate intestinal cholesterol excretion. *Trends Pharmacol Sci* 36:440–451
 12. van der Veen JN, van Dijk TH, Vrans CLJ, van Meer H, Havinga R, Bijsterveld K, Tietge UJF, Groen AK, Kuipers F (2009) Activation of the liver x receptor stimulates trans-intestinal excretion of plasma cholesterol. *J Biol Chem* 284:19211–19219
 13. Jakulj L, Vissers MN, van Roomen CP, van der Veen JN, Vrans CLJ, Kunne C, Stellaard F, Kastelein JJP, Groen AK (2010) Ezetimibe stimulates faecal neutral sterol excretion depending on abcg8 function in mice. *FEBS Lett* 584:3625–3628
 14. Brufau G, Kuipers F, Lin Y, Trautwein EA, Groen AK (2011) A reappraisal of the mechanism by which plant sterols promote neutral sterol loss in mice. *PLoS ONE* 6:e21576
 15. Hidalgo IJ, Raub TJ, Borchardt RT (1989) Characterization of the human colon carcinoma cell line (caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* 96:736–749
 16. Briand O, Touche V, Colin S, Brufau G, Davalos A, Schonewille M, Bovenga F, Carrière V, de Boer JF, Dugardin C, Riveau B, Clavey V, Tailleux A, Moschetta A, Lasunción MA, Groen AK, Staels B, Lestavel S (2016) Liver X receptor regulates triglyceride absorption through intestinal down-regulation of scavenger receptor class B, type 1. *Gastroenterology* 150:650–658
 17. Colin S, Briand O, Touche V, Wouters K, Baron M, Pattou F, Hanf R, Tailleux A, Chinetti G, Staels B, Lestavel S (2013) Activation of intestinal peroxisome proliferator-activated receptor- α increases high-density lipoprotein production. *Eur Heart J* 34:2566–2574
 18. Chateau D, Pauquai T, Delers F, Rousset M, Chambaz J, Demignot S (2005) Lipid micelles stimulate the secretion of triglyceride-enriched apolipoprotein B48-containing lipoproteins by Caco-2 cells. *J Cell Physiol* 202:767–776
 19. Bouchoux J, Beilstein F, Pauquai T, Guerrero IC, Chateau D, Ly N, Alqub M, Klein C, Chambaz J, Rousset M, Lacorte J, Morel E, Demignot S (2011) The proteome of cytosolic lipid droplets isolated from differentiated Caco-2/TC7 enterocytes reveals cell-specific characteristics. *Biol Cell* 103:499–517
 20. Peterson GL (1977) A simplification of the protein assay method of lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem* 83:346–356
 21. Rashid S, Tavori H, Brown PE, Linton MF, He J, Giunzioni I, Fazio S (2014) Proprotein convertase subtilisin kexin type 9 promotes intestinal overproduction of triglyceride-rich apolipoprotein b lipoproteins through both low-density lipoprotein receptor-dependent and -independent mechanisms. *Circulation* 130:431–441
 22. Donovan JM, Timofeyeva N, Carey MC (1991) Influence of total lipid concentration, bile salt:lecithin ratio, and cholesterol content on inter-mixed micellar/vesicular (non-lecithin-associated) bile salt concentrations in model bile. *J Lipid Res* 32:1501–1512
 23. Maxfield FR, Wüstner D (2002) Intracellular cholesterol transport. *J Clin Invest* 110:891–898
 24. Admirand WH, Small DM (1968) The physicochemical basis of cholesterol gallstone formation in man. *J Clin Invest* 47:1043–1052
 25. Temel RE, Brown JM (2012) Biliary and nonbiliary contributions to reverse cholesterol transport. *Curr Opin Lipidol* 23:85–90
 26. Nakano T, Inoue I, Takenaka Y, Ono H, Katayama S, Awata T, Murakoshi T (2016) Ezetimibe promotes brush border membrane-to-lumen cholesterol efflux in the small intestine. *PLoS ONE* 11:e0152207
 27. Apodaca G (2001) Endocytic traffic in polarized epithelial cells: role of the actin and microtubule cytoskeleton. *Traffic* 2:149–159
 28. Kiss AL, Botos E (2009) Endocytosis via caveolae: alternative pathway with distinct cellular compartments to avoid lysosomal degradation? *J Cell Mol Med* 13:1228–1237
 29. Frank PG, Pavlides S, Lisanti MP (2009) Caveolae and transcytosis in endothelial cells: role in atherosclerosis. *Cell Tissue Res* 335:41–47

12.2 L'excretion trans- intestinale de cholesterol (TICE)

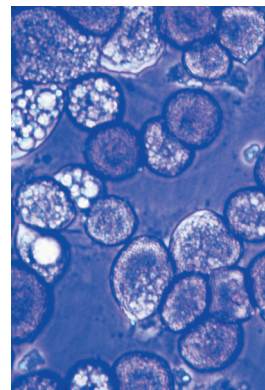
**Une nouvelle voie d'epuration du cholesterol plas-
matique**

► L'intestin joue un rôle crucial dans l'absorption et la sécrétion lymphatique du cholestérol sous forme de chylomicrons. La découverte de l'excrétion *trans*-intestinale de cholestérol (TICE) renforce l'implication de l'intestin dans le métabolisme du cholestérol. Le TICE est inductible, complémentaire de l'excrétion par la voie biliaire, et permet l'élimination directe du cholestérol sanguin dans la lumière intestinale. Cette voie est mal caractérisée, mais plusieurs acteurs moléculaires du TICE ont été récemment identifiés. Deux études montrent que le TICE est impliqué dans la voie du transport inverse du cholestérol, anti-athérogène, suggérant que sa stimulation pourrait contribuer à réduire les maladies cardiovasculaires. ◀

L'excrétion *trans*-intestinale de cholestérol (TICE)

Une nouvelle voie d'épuration du cholestérol plasmatique

Claire Blanchard, François Moreau, Bertrand Cariou, Cédric Le May



IRS-UN, institut du thorax, unité Inserm UMR 1087/CNRS UMR 6291, 8, quai Moncoussu, 44007 Nantes Cedex 1, France. cedric.lemay@univ-nantes.fr
C. Blanchard et F. Moreau ont contribué de manière équivalente à la rédaction du manuscrit.

Arguments en faveur d'une excrétion *trans*-intestinale de cholestérol

La rédaction de cet article¹ intervient à la veille d'une nouvelle étude réalisée par l'unité de surveillance et d'épidémiologie nutritionnelles dans le cadre du programme national nutrition-santé 2011-2015 visant, entre autres, à déterminer l'état nutritionnel des Français. Il a ainsi été estimé en 2007 que 37,4 % des Français âgés de 65 à 74 ans étaient traités par des molécules hypolipémiantes. L'hypercholestérolémie constitue un des facteurs de risque cardiovasculaires modifiables, et des bénéfices cardiovasculaires sont associés à une diminution de la concentration en LDL (*low density lipoprotein*)-cholestérol (LDLc). Les statines, qui ciblent spécifiquement le LDLc, sont prescrites en première intention, surtout en prévention secondaire des maladies cardiovasculaires. Néanmoins, elles ne permettent pas, chez les patients à très haut risque cardiovasculaire, d'atteindre les objectifs thérapeutiques recommandés (LDLc < 0,7 g/l) [1]. De nouvelles recherches sont donc en cours pour identifier de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à réduire le LDLc [2].

Jusqu'à récemment, la voie hépatobiliaire était considérée comme la seule voie d'élimination du cholestérol sanguin (Figure 1). Celui-ci est capté par le foie, puis excrété dans la bile *via* le canal cholédoque, sous forme de cholestérol ou après sa conversion en acides biliaires. Une fois dans l'intestin, le cholestérol est soit réabsorbé (environ 50 %), soit éliminé dans les fèces.

Cependant, une altération de l'excrétion biliaire de cholestérol n'a pas nécessairement de conséquence sur l'excrétion fécale de cholestérol [3]. Ainsi, Sperry en 1927 ou Pertsemlidis *et al.* en 1973, ont montré que des chiens porteurs d'une dérivation externe de la voie biliaire excrétaient beaucoup plus de cholestérol dans leurs fèces qu'attendu [4]. L'émergence de modèles de rongeurs génétiquement modifiés a permis de confirmer ces premières observations. Ainsi, chez les souris déficientes en transporteurs ABCG5 (*ATP-binding cassette G5*) et ABCG8, l'excrétion biliaire de cholestérol est réduite de 90 % sans que l'absorption intestinale de cholestérol ne soit altérée [5]. Toutefois, ces souris ne présentent qu'une baisse modérée, de l'ordre de 30 à 50 %, de l'excrétion fécale de cholestérol [5]. Les souris déficientes pour le transporteur ABCB4, que caractérise une altération majeure de l'excrétion biliaire des phospholipides et du cholestérol, conservent la capacité d'excréter par voie fécale du cholestérol radiomarqué préalablement injecté par voie veineuse [6]. Enfin, la surexpression hépatique du transporteur Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1) chez la souris (souris transgéniques

¹ Cette revue a été écrite dans le cadre des « Ateliers du DHU » organisés par le DHU 2020 du CHU de Nantes.

NPC1L1) entraîne la réabsorption par les hépatocytes de 90 % du cholestérol excrété dans la bile sans pour autant altérer l'excrétion biliaire des phospholipides et des acides biliaires, l'absorption intestinale ou l'excrétion fécale du cholestérol [7]. L'ensemble de ces travaux suggèrent indirectement l'existence d'une voie alternative intestinale permettant l'élimination directe du cholestérol plasmatique.

En 2007, l'équipe hollandaise de Groen a apporté la première démonstration de l'existence d'une excrétion *trans*-intestinale de cholestérol sanguin (TICE) (Figure 1) [8]. Les chercheurs ont créé une dérivation de la voie biliaire et perfusé la lumière intestinale avec une solution iso-osmotique contenant des accepteurs de cholestérol ; puis ils ont mesuré, 30 minutes après l'injection par voie veineuse de cholestérol radioactif, son apparition dans les perfusats intestinaux. Enfin, ce même groupe a démontré que le TICE est principalement actif dans la partie proximale de l'intestin ; les auteurs ont estimé que, chez des souris C57BL6, 33 % du cholestérol fécal proviendraient du TICE, alors que 17 % proviendraient de la voie biliaire. Ces résultats font du TICE une voie majeure d'épuration du cholestérol de l'organisme [9]. Cependant, la contribution relative cette voie à l'excrétion fécale de cholestérol est probablement dépendante du fonds génétique de la souris étudiée ; chez les souris FVB (*Friend virus B-type*), la contribution du TICE serait de 20 % [6].

À l'heure actuelle, les mécanismes moléculaires régulant cette voie métabolique restent très mal caractérisés. Cette revue résume les connaissances actuellement disponibles sur le TICE.

Quelles lipoprotéines fournissent le cholestérol au TICE ?

Le cholestérol, du fait de son hydrophobicité, circule au niveau sanguin dans des complexes moléculaires sphériques constitués de lipides et de protéines (apolipoprotéines, Apo) nommés lipoprotéines. On

distingue deux grandes classes de lipoprotéines : les lipoprotéines à Apo-B (chylomicrons, VLDL [*very low density lipoprotein*], LDL) et les lipoprotéines à Apo-A (HDL, *high density lipoprotein*).

L'une des questions actuellement étudiée est de savoir quelle lipoprotéine fournit préférentiellement le cholestérol pour le TICE. Plusieurs études suggèrent que ce sont les lipoprotéines à Apo-B (Figure 2). Ainsi, nous avons montré, *in vivo* chez la souris et *ex vivo* sur des explants de souris sauvages et sur des biopsies jéjunales humaines, que les LDL étaient capables d'apporter du cholestérol au TICE [10]. La même année, Marshall *et al.* ont mis en évidence que les VLDL étaient probablement également impliquées. Ainsi, la réduction de production de VLDL par l'administration d'oligonucléotides antisens dirigés contre la protéine microsomale de transfert des triglycérides (MTP, *microsomal triglyceride transfer protein*) réduit significativement le TICE [11]. Le rôle des HDL dans le TICE reste à ce jour plus débattu. Plösch *et al.* ont montré que l'activation des récepteurs nucléaires LXR (*liver X receptor*) augmente l'excrétion fécale de cholestérol de façon similaire chez les souris sauvages et les souris invalidées pour le transporteur ABCA1, chez lesquelles on observe une quasi absence de HDL circulants [12]. De même, les agonistes LXR, des stimulateurs reconnus du TICE (voir plus loin [6, 9]), réduisent dans les mêmes conditions expérimentales l'accumulation intestinale d'éther de cholestérol (cholestérol non métabolisable) provenant d'HDL, faisant douter de l'importance fonctionnelle des HDL dans le TICE [13]. Deux études récentes ont

mesuré de façon directe le TICE après une injection intraveineuse d'HDL marqués au cholestérol radioactif. La première suggère que les HDL ont un rôle négligeable dans le TICE [14]. Dans la seconde, nous avons montré que l'activité du TICE est comparable lorsque le cholestérol est apporté par des HDL ou des LDL [10]. Clairement, des études plus approfondies seront nécessaires pour valider ou invalider le rôle physiologique des HDL dans le TICE (Figure 2).

Identification des transporteurs de cholestérol impliqués dans le TICE

Le récepteur *scavenger* de classe BI (SRBI), connu pour interagir avec les LDL et HDL, est exprimé au niveau apical et basolatéral des entérocytes. Van der Velde *et al.* ont montré que des souris FVB, nourries avec un régime hyperlipidique ou de type *western*, ont un TICE significativement augmenté par rapport aux souris soumises à un régime

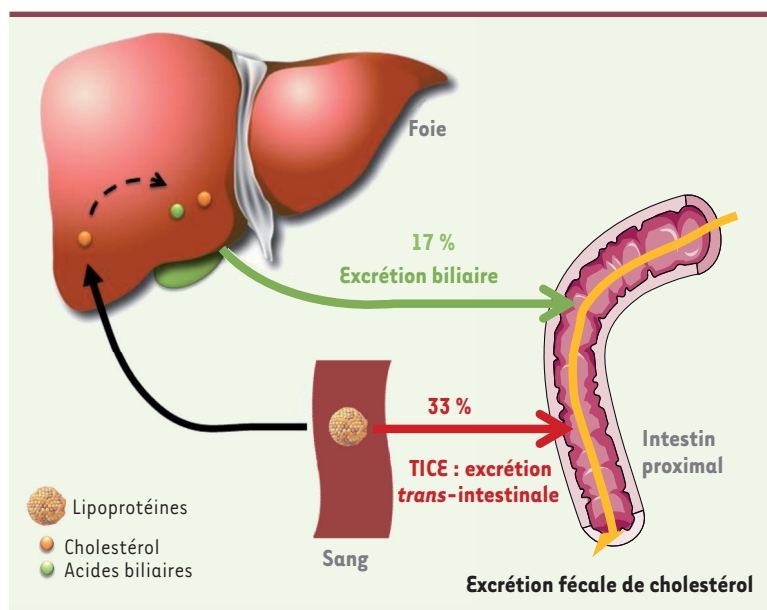


Figure 1. Représentation schématique de l'excrétion trans-intestinale de cholestérol et de l'excrétion biliaire.

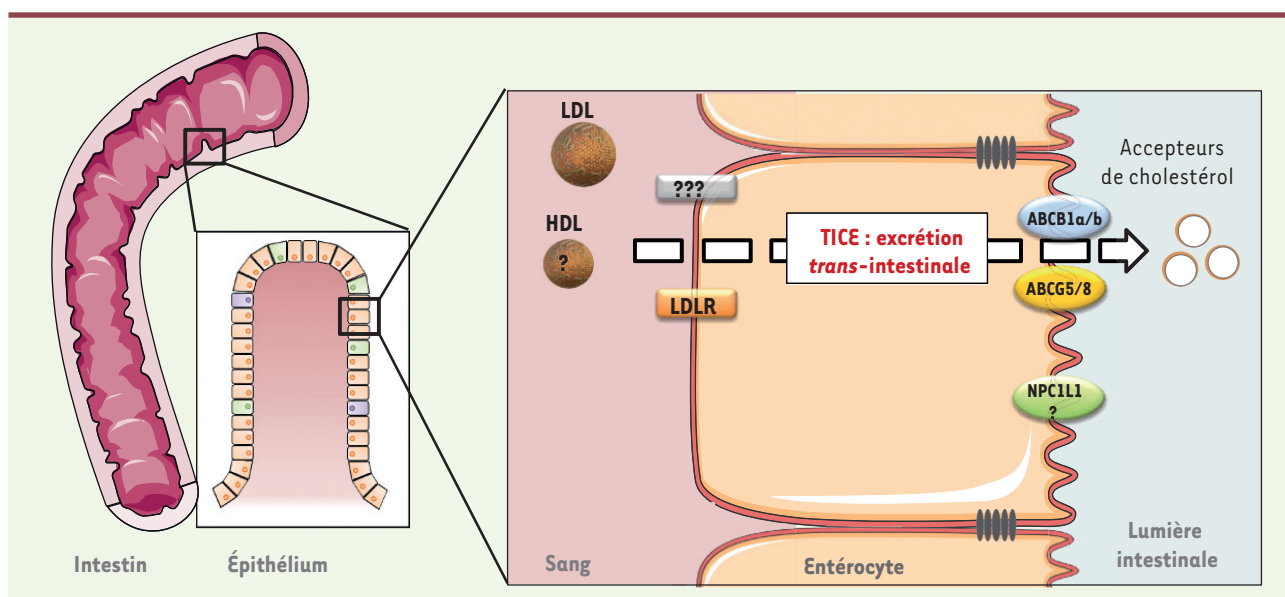


Figure 2. Acteurs moléculaires impliqués dans le TICE. Certains acteurs impliqués ou potentiellement impliqués dans le TICE sont représentés : les LDL et leur récepteur (LDLR), les HDL et certains transporteurs intestinaux (ABCB1a/b, ABCG5/8 et NPC1L1).

contrôle [15] (voir plus loin), et ces régimes induisent également l'expression intestinale de SRBI [15]. Au vu de cette corrélation, les auteurs ont suggéré que SRBI pourrait être impliqué de façon active dans le TICE. Néanmoins, chez des souris *SRBI knocked-out* (KO), le TICE est, soit non modifié [14], soit significativement augmenté [15]. De même, une surexpression intestinale de SRBI chez des souris présentant un défaut d'excrétion biliaire de cholestérol n'a pas d'effet notable sur l'excrétion fécale de cholestérol [16]. Ces résultats suggèrent que SRBI ne joue pas un rôle majeur sur l'activité du TICE. De manière alternative, il est également envisageable que la déficience totale de SRBI soit compensée par d'autres protéines exprimées au pôle basolatéral.

Le récepteur des LDL (LDLR) est exprimé à la membrane basolatérale des entérocytes, où il assure l'essentiel du captage entérocytaire des LDL chez les rongeurs (Figure 2) [10]. Les souris déficientes en protéine convertase subtilisine kexin de type 9 (souris PCSK9), un inhibiteur naturel du LDLR, se caractérisent par une quantité élevée de LDLR intestinal et un TICE significativement augmenté par rapport à celui des souris sauvages [10]. À l'inverse, l'injection de protéine PCSK9 recombinante chez ces souris déficientes dégrade le LDLR intestinal et réduit de 35 % le TICE. L'effet inhibiteur de PCSK9 sur le TICE est dépendant du LDLR, car il n'est pas observé chez des souris LDLR-KO [10]. De façon concordante, les statines, qui augmentent l'expression du LDLR, stimulent le TICE chez des souris sauvages, mais sont sans effet chez des souris LDLR-KO. Ces résultats suggèrent que le LDLR est un acteur clé du TICE, car la modulation aiguë de son expression modifie les niveaux du TICE. Néanmoins, de manière inattendue, la déficience en LDLR chez la souris ne diminue pas le TICE, mais tend à l'augmenter, ce qui suggère la mise en place de voies alternatives de compensation à long terme, qui restent à identifier [10].

À l'heure actuelle, aucune protéine intracellulaire de l'entérocyte n'a été identifiée comme impliquée dans le transport du cholestérol

via le TICE. Cependant, les protéines NPC1, NPC2, MLN64 (*metastatic lymph node 64 protein*, anciennement STARD3), ORP1L (*oxysterol-binding protein 1L*), LIMP2 (*lysosomal integral membrane protein 2*), ACAT2 (*acetyl-CoA acetyltransferase 2*), Rab7 et Rab9, constituent des candidats potentiels intéressants, compte tenu de leur rôle primordial dans le transport intracellulaire de cholestérol. Par ailleurs, l'activation du récepteur nucléaire PPAR δ (*peroxisome proliferator-activated receptor δ*), un inducteur du TICE, augmente l'expression de Rab9 et LIMP2 au niveau intestinal [17]. Au pôle apical des entérocytes, trois complexes protéiques ont été proposés comme contribuant au TICE (Figure 2). La protéine NPC1L1 a été initialement identifiée comme étant le transporteur clé de l'absorption intestinale de cholestérol et la cible moléculaire de l'ézétimibe, un hypolipémiant utilisé en clinique [18]. Deux études utilisant l'ézétimibe pour inhiber NPC1L1 ont présenté des résultats contradictoires sur le TICE. La première étude a montré que l'ézétimibe était sans effet sur le TICE [17], tandis que la seconde a retrouvé une forte induction du TICE [19]. L'hétérodimère ABCG5/ABCG8, impliqué initialement dans l'absorption intestinale du cholestérol, assure une partie de l'efflux apical du TICE (Figure 2). Si la déficience en ABCG8 n'a pas de conséquence sur le TICE [8], celle-ci est réduite de 40 % chez les souris ABCG5-KO par rapport aux souris sauvages [9]. Plus récemment, le rôle du transporteur aux xénobiotiques ABCB1 (ou PGP, *permeability glycoprotein*) a été exploré. ABCB1 est localisé sur la membrane apicale des entérocytes et son rôle dans la résistance

aux antibiotiques est bien caractérisé [20]. Nous avons montré, chez des souris déficientes pour les deux isoformes d'ABCB1, une réduction significative de l'excrétion fécale de cholestérol et une diminution de 20 % du TICE [10]. De même, l'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique d'ABCB1, le PSC-833, réduit significativement le TICE *ex vivo* sur des explants de souris sauvages, mais est sans effet sur des explants de souris déficientes pour les deux formes d'ABCB1 [10].

Le TICE : une voie métabolique inductible

Chez la souris, le TICE est inductible et modulable par des éléments nutritionnels et pharmacologiques (Figure 3). Van der Velde *et al.* ont ainsi mis en évidence que la présence d'accepteurs du cholestérol dans la lumière intestinale le stimule fortement [8, 15]. En effet, *in vivo*, le TICE est détectable, mais faible, en l'absence d'accepteurs du cholestérol, et plus de 80 % du cholestérol présent dans les perfusats intestinaux ont alors pour origine la seule desquamation entérocytaire. Le taurocholate (TC), un acide biliaire, ou la phosphatidylcholine (PC) stimulent individuellement le TICE, mais avec une efficacité moindre que le mélange TC/PC. Ces molécules permettent la formation de micelles qui vont pouvoir solubiliser le cholestérol excrété par les cellules intestinales. De plus, chez la souris, il semble que le TICE soit peu sensible à la concentration des acides biliaires dans la lumière intestinale et au type d'acides présents [15].

Le statut nutritionnel influe également sur le TICE. Celui-ci est ainsi stimulé respectivement de 50 ou 100 % par les régimes de type *western* ou hyperlipidique [8]. De plus, un jeûne de courte durée (12 h) réduit le TICE de 28 %, tandis qu'un jeûne prolongé (48 h) l'augmente de 50 % [21]. En plus de leur effet inhibiteur sur l'absorption intestinale du cholestérol [22], les phytostérols stimulent significativement le TICE (Figure 3) [23].

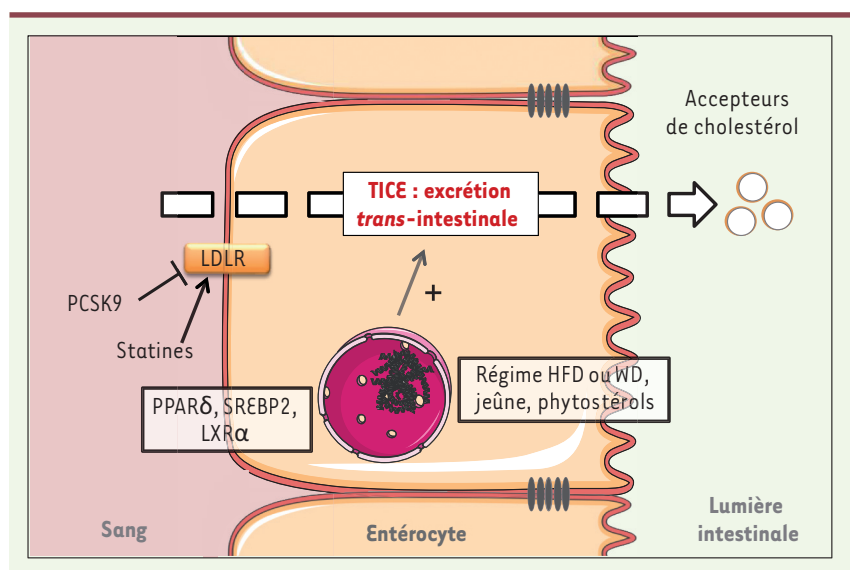


Figure 3. Modulateurs du TICE. Le TICE est régulé par le statut nutritionnel, les statines, les phytostérols, les agonistes des LXR, ainsi que par le PPAR γ . SREBP2 : *sterol regulatory element-binding protein 2* ; HFD : *high fat diet* ; WD : *western diet*.

Enfin, le TICE est induit par des agents pharmacologiques. L'activation de LXR le stimule fortement [6, 9]. Lorsque des souris sauvages sont nourries avec un régime contenant des agonistes des LXR, leur excrétion fécale de cholestérol est multipliée par trois et la contribution relative du TICE passe de 33 % à 63 % [9]. De même, l'activation de PPAR δ [17] ou l'inhibition de NPC1L1 par l'ézétimibe chez la souris augmentent le TICE [19]. Enfin, les statines stimulent le TICE de 71 % et cette activation pourrait en partie contribuer à leur action hypocholestérolémiant (Figure 3) [10].

TICE et transport inverse du cholestérol

Le transport inverse du cholestérol (RCT, *reverse cholesterol transport*) assure le retour du cholestérol des tissus périphériques vers le foie *via* les HDL, et son élimination par voie biliaire [24]. L'activation de cette voie contribue à réduire le cholestérol contenu dans la plaque athéromateuse artérielle et, de ce fait, est considérée comme anti-athérogène. En 2010, une étude a remis en question le dogme faisant de la voie biliaire un élément essentiel du transport inverse du cholestérol. En effet, après l'injection de macrophages chargés en cholestérol tritié, l'excrétion fécale de cholestérol tritié était comparable chez des souris sauvages et des souris transgéniques NPC1L1 qui n'excrètent plus de cholestérol biliaire [7]. Ce résultat est extrêmement important, car il suggère qu'une stimulation thérapeutique du TICE pourrait avoir une action anti-athérogène. Toutefois, un an plus tard, une seconde équipe, à l'aide d'un autre modèle

de souris présentant un défaut majeur d'excrétion biliaire (les souris ABCB4-KO), a abouti à la conclusion inverse, à savoir que l'intestin ne peut compenser le défaut hépatique [13]. Cette dernière observation a été renforcée par une autre étude reposant sur l'utilisation de souris NPC1L1-KO surexprimant ou non la protéine NPC1L1 au niveau hépatique [25]. Chez ces souris NPC1L1-KO, caractérisées par un défaut majeur d'absorption intestinale de cholestérol, l'élimination du cholestérol macrophagique par la voie du transport inverse du cholestérol est dépendante d'une voie hépatobiliaire pleinement fonctionnelle [25]. Toutefois, une étude récente atteste de l'importance fonctionnelle du TICE dans le transport inverse du cholestérol. En effet, l'inhibition pharmacologique de la MTP (*microsomal triglyceride transfer protein*)

stimule le transport inverse du cholestérol et l'excrétion fécale de cholestérol marqué d'origine macrophagique, sans pour autant augmenter l'excrétion biliaire de cholestérol marqué, suggérant un rôle de l'intestin [26]. Le rôle du TICE dans le transport inverse du cholestérol demeure donc controversé.

TICE : les données chez l'homme

La preuve directe de l'existence d'une excrétion *trans*-intestinale de cholestérol chez l'homme doit être encore établie. La difficulté réside dans le fait que cette excrétion *trans*-intestinale et l'excrétion biliaire de cholestérol ont lieu dans la même région anatomique, au niveau de l'intestin proximal. Il est donc nécessaire d'avoir accès à des modèles porteurs d'une dérivation externe ou d'une obstruction complète de la voie hépatobiliaire. Néanmoins, quelques anciennes études cliniques suggèrent de manière indirecte l'existence du TICE chez l'homme. Les premières études, parues en 1959, ont mis en évidence, chez des patients présentant une obstruction de la voie biliaire (en raison d'une tumeur de la tête du pancréas), l'existence d'une excrétion intestinale de 250-400 mg/jour de cholestérol [27, 28]. En utilisant un système de tube à triple lumière inséré dans l'intestin, Simmonds *et al.* ont estimé que l'intestin humain produisait 44 % de la quantité de cholestérol retrouvée au niveau des fèces [29]. Cependant, il est impossible dans cette étude de déterminer les proportions de cholestérol provenant du TICE et de la desquamation des cellules intestinales.

Récemment, nous avons apporté la première preuve que l'intestin humain cultivé *ex vivo* est capable d'excréter du cholestérol directement au niveau du pôle apical des entérocytes. En utilisant des biopsies jéjunales montées sur des chambres d'Ussing, nous avons pu mesurer le TICE en présence de cholestérol sous forme de LDL ou de HDL. De plus, le TICE a pu être stimulée par l'ajout, dans le compartiment apical, de milieu enrichi en phospholipides et en acides biliaires [10]. Dans une étude cinétique non publiée (*International symposium on atherosclerosis 2012*) utilisant des radio-isotopes stables, le groupe de A. Groen estime que le TICE serait à l'origine de plus de 30 % des pertes fécales totales des stérols neutres chez des hommes modérément hypercholestérolémiques.

Conclusion

Le TICE représente une nouvelle voie d'excrétion du cholestérol qui reste à ce jour très mal caractérisée. La question de son implication dans le transport inverse du cholestérol est cruciale et la réponse déterminera si la stimulation spécifique de cette voie métabolique peut être utilisée pour réduire la cholestérolémie, ainsi que l'athérosclérose et ses conséquences cardiovasculaires. Si l'hypothèse de la stimulation pharmacologique du transport inverse du cholestérol par l'augmentation de l'excrétion biliaire de cholestérol est peu envisageable du fait des risques de développement de calculs biliaires, il n'existe pas à l'heure actuelle d'arguments suggérant que l'activation du TICE pourrait avoir des conséquences néfastes pour la santé. ♦

SUMMARY

Trans-intestinal cholesterol excretion (TICE): a new route for cholesterol excretion

The small intestine plays a crucial role in dietary and biliary cholesterol absorption, as well as its lymphatic secretion as chylomicrons (lipoprotein exogenous way). Recently, a new metabolic pathway called TICE (trans-intestinal excretion of cholesterol) that plays a central role in cholesterol metabolism has emerged. TICE is an inducible way, complementary to the hepatobiliary pathway, allowing the elimination of the plasma cholesterol directly into the intestine lumen through the enterocytes. This pathway is poorly characterized but several molecular actors of TICE have been recently identified. Although it is a matter of debate, two independent studies suggest that TICE is involved in the anti-atherogenic reverse cholesterol transport pathway. Thus, TICE is an innovative drug target to reduce cardiovascular diseases. ♦

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Catapano AL, Chapman J, Wiklund O, Taskinen MR. The new joint EAS/ESC guidelines for the management of dyslipidaemias. *Atherosclerosis* 2011; 217 : 3-46.
2. Costet P. Molecular pathways and agents for lowering LDL-cholesterol in addition to statins. *Pharmacol Ther* 2010; 126 : 263-78.
3. Brufau G, Groen AK, Kuipers F. Reverse cholesterol transport revisited: contribution of biliary versus intestinal cholesterol excretion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011; 31 : 1726-33.
4. Pertsemilidis D, Kirchman EH, Ahrens EH. Regulation of cholesterol metabolism in the dog. I. Effects of complete bile diversion and of cholesterol feeding on absorption, synthesis, accumulation, and excretion rates measured during life. *J Clin Invest* 1973; 52 : 2353-67.
5. Yu L, Hammer RE, Li-Hawkins J, *et al.* Disruption of *Abcg5* and *Abcg8* in mice reveals their crucial role in biliary cholesterol secretion. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99 : 16237-42.
6. Kruit JK, Plösch T, Havinga R, *et al.* Increased fecal neutral sterol loss upon liver X receptor activation is independent of biliary sterol secretion in mice. *Gastroenterology* 2005; 128 : 147-56.
7. Temel RE, Sawyer JK, Yu L, *et al.* Biliary sterol secretion is not required for macrophage reverse cholesterol transport. *Cell Metab* 2010; 12 : 96-102.
8. Van der Velde AE, Vriens CL, Van den Oever K, *et al.* Direct intestinal cholesterol secretion contributes significantly to total fecal neutral sterol excretion in mice. *Gastroenterology* 2007; 133 : 967-75.
9. Van der Veen JN, Van Dijk TH, Vriens CL, *et al.* Activation of the liver X receptor stimulates trans-intestinal excretion of plasma cholesterol. *J Biol Chem* 2009; 284 : 19211-9.
10. Le May C, Berger JM, Lespina A, *et al.* Transintestinal cholesterol excretion is an active metabolic process modulated by PCSK9 and statin involving ABCB1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013; 33 : 1484-93.
11. Marshall SM, Kelley KL, Davis MA, *et al.* Reduction of VLDL secretion decreases cholesterol excretion in Niemann-Pick C1-like 1 hepatic transgenic mice. *PLoS One* 2014; 9 : e84418.
12. Plösch T, Kok T, Bloks VW, *et al.* Increased hepatobiliary and fecal cholesterol excretion upon activation of the liver X receptor is independent of ABCA1. *J Biol Chem* 2002; 277 : 33870-7.
13. Nijstad N, Gautier T, Briand F, *et al.* Biliary sterol secretion is required for functional *in vivo* reverse cholesterol transport in mice. *Gastroenterology* 2011; 140 : 1043-51.

RÉFÉRENCES

14. Vrins CL, Ottenhoff R, Van den Oever K, *et al.* Trans-intestinal cholesterol efflux is not mediated through high density lipoprotein. *J Lipid Res* 2012 ; 53 : 2017-23.
15. Van der Velde AE, Vrins CL, Van den Oever K, *et al.* Regulation of direct transintestinal cholesterol excretion in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008 ; 295 : G203-8.
16. Bura KS, Lord C, Marshall S, *et al.* Intestinal SR-BI does not impact cholesterol absorption or transintestinal cholesterol efflux in mice. *J Lipid Res* 2013 ; 54 : 1567-77.
17. Vrins CL, Van der Velde AE, Van den Oever K, *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor delta activation leads to increased transintestinal cholesterol efflux. *J Lipid Res* 2009 ; 50 : 2046-54.
18. Altmann SW, Davis HR, Zhu LJ, *et al.* Niemann-Pick C1 like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science* 2004 ; 303 : 1201-4.
19. Jakulj L, Vissers MN, Van Roomen CP, *et al.* Ezetimibe stimulates faecal neutral sterol excretion depending on abcg8 function in mice. *FEBS Lett* 2010 ; 584 : 3625-8.
20. Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, *et al.* Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987 ; 84 : 7735-8.
21. Sokolović M, Sokolović A, Van Roomen CP, *et al.* Unexpected effects of fasting on murine lipid homeostasis: transcriptomic and lipid profiling. *J Hepatol* 2010 ; 52 : 737-44.
22. Heinemann T, Kullak-Ublick GA, Pietruck B, von Bergmann K. Mechanisms of action of plant sterols on inhibition of cholesterol absorption. Comparison of sitosterol and sitostanol. *Eur J Clin Pharmacol* 1991 ; 40 (suppl 1) : S59-63.
23. Brufau G, Kuipers F, Lin Y, *et al.* A reappraisal of the mechanism by which plant sterols promote neutral sterol loss in mice. *PLoS One* 2011 ; 6 : e21576.
24. Glomset, JA. The plasma lecithins:cholesterol acyltransferase reaction. *J Lipid Res* 1968 ; 9 : 155-67.
25. Xie P, Jia L, Ma Y, *et al.* Ezetimibe inhibits hepatic Niemann-Pick C1-Like 1 to facilitate macrophage reverse cholesterol transport in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013 ; 33 : 920-5.
26. Dijkers A, Annema W, de Boer JF, *et al.* Differential impact of hepatic deficiency and total body inhibition of MTP on cholesterol metabolism and RCT in mice. *J Lipid Res* 2014 ; 55 : 816-25.
27. Cheng SH, Stanley MM. Secretion of cholesterol by intestinal mucosa in patients with complete common bile duct obstruction. *Proc Soc Exp Biol Med* 1959 ; 101 : 223-5.
28. Stanley MM, Pineda EP, Cheng SH. Serum cholesterol esters and intestinal cholesterol secretion and absorption in obstructive jaundice due to cancer. *N Engl J Med* 1959 ; 261 : 368-73.
29. Simmonds WJ, Hofmann AF, Theodor E. Absorption of cholesterol from a micellar solution: intestinal perfusion studies in man. *J Clin Invest* 1967 ; 46 : 874-90.

TIRÉS À PART

C. Le May



The Minicircle Company

Service ADN *minicirculaire* et ADN plasmidique

- Production d'ADN *minicirculaire* et de plasmides en fonction des besoins du client
- *Service en stock* de gènes rapporteurs, plasmides ou ADN *minicirculaire* (GFP, lacZ, luc, miniS/MAR etc.)
- *Service en stock* pour les plasmides auxiliaires AAV et d'emballage (par ex. pDG/pDP)
- Qualité certifiée et constante
- Option *High Quality*: ADN pour production *GMP* d'ARN et de vecteurs viraux
- QC comprenant une analyse CGE des topologies de l'ADN
- Études sur la stabilité et la conservation

Made in
Germany

PlasmidFactory.com

PlasmidFactory GmbH & Co. KG | Meisenstraße 96 | D-33607 Bielefeld | Germany | Fon ++49 521 2997350

Bibliographie

- [1] Prospective Studies COLLABORATION et al., « Blood cholesterol and vascular mortality by age, sex, and blood pressure : a meta-analysis of individual data from 61 prospective studies with 55 000 vascular deaths », *in* : *The Lancet* 370.9602 (2007), p. 1829–1839.
- [2] J FERRIERES et al., « Prévalence des dyslipidémies dans un échantillon représentatif de la population française », *in* : *Archives des maladies du coeur et des vaisseaux* 98.2 (2005), p. 127–132.
- [3] Anders G OLSSON et al., « Can LDL cholesterol be too low? Possible risks of extremely low levels », *in* : *Journal of Internal Medicine* 281.6 (2017), p. 534–553.
- [4] RJ DECKELBAUM et al., « Failure of complete bile diversion and oral bile acid therapy in the treatment of homozygous familial hypercholesterolemia », *in* : *New England Journal of Medicine* 296.9 (1977), p. 465–470.
- [5] E REIHNER et al., « Influence of pravastatin, a specific inhibitor of HMG-CoA reductase, on hepatic metabolism of cholesterol », *in* : *Fortschritte der Medizin* 109.8 (1991), p. 53–60.
- [6] CG HILLEBRANT et al., « The effect of plasma low density lipoprotein apheresis on the hepatic secretion of biliary lipids in humans », *in* : *Gut* 41.5 (1997), p. 700–704.
- [7] Jennifer G ROBINSON et al., « Efficacy and safety of alirocumab in reducing lipids and cardiovascular events », *in* : *New England Journal of Medicine* 372.16 (2015), p. 1489–1499.
- [8] Dirk J BLOM et al., « Effects of evolocumab on vitamin E and steroid hormone levels : results from the 52-week, phase 3, double-blind, randomized, placebo-controlled DESCARTES study », *in* : *Circulation research* (2015), CIRCRESAHA–115.

-
- [9] John M DIETSCHY, « Central nervous system : cholesterol turnover, brain development and neurodegeneration », *in* : *Biological chemistry* 390.4 (2009), p. 287–293.
- [10] Ingemar BJÖRKHEM et Steve MEANEY, « Brain cholesterol : long secret life behind a barrier », *in* : *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 24.5 (2004), p. 806–815.
- [11] Luis G ALMEIDA-MONTES et al., « Relation of serum cholesterol, lipid, serotonin and tryptophan levels to severity of depression and to suicide attempts. », *in* : *Journal of Psychiatry and Neuroscience* 25.4 (2000), p. 371.
- [12] Matthew F MULDOON, JANINE D FLORY et Christopher M RYAN, « Serum cholesterol, the brain, and cognitive functioning », *in* : *Neuropsychology of Cardiovascular Disease. Mahwah, NJ* (2001), p. 37–59.
- [13] Jon WHITE et al., « Association of lipid fractions with risks for coronary artery disease and diabetes », *in* : *JAMA cardiology* 1.6 (2016), p. 692–699.
- [14] Amand F SCHMIDT et al., « PCSK9 genetic variants and risk of type 2 diabetes : a mendelian randomisation study », *in* : *The lancet Diabetes & endocrinology* 5.2 (2017), p. 97–105.
- [15] David PREISS et al., « Risk of incident diabetes with intensive-dose compared with moderate-dose statin therapy : a meta-analysis », *in* : *Jama* 305.24 (2011), p. 2556–2564.
- [16] Joost BESSELING et al., « Association between familial hypercholesterolemia and prevalence of type 2 diabetes mellitus », *in* : *Jama* 313.10 (2015), p. 1029–1036.
- [17] Jennifer G ROBINSON et al., « Safety of very low low-density lipoprotein cholesterol levels with alirocumab : pooled data from randomized trials », *in* : *Journal of the American College of Cardiology* 69.5 (2017), p. 471–482.
- [18] Joseph L GOLDSTEIN et Michael S BROWN, « A century of cholesterol and coronaries : from plaques to genes to statins », *in* : *Cell* 161.1 (2015), p. 161–172.
- [19] Sabine RÜTTI et al., « Low-and high-density lipoproteins modulate function, apoptosis, and proliferation of primary human and murine pancreatic β -cells », *in* : *Endocrinology* 150.10 (2009), p. 4521–4530.

-
- [20] Janine K KRUIT et al., « HDL and LDL cholesterol significantly influence β -cell function in type 2 diabetes mellitus », *in* : *Current opinion in lipidology* 21.3 (2010), p. 178–185.
- [21] Yu-Fen CHIEN et al., « Decreased serum level of lipoprotein cholesterol is a poor prognostic factor for patients with severe community-acquired pneumonia that required intensive care unit admission », *in* : *Journal of critical care* 30.3 (2015), p. 506–510.
- [22] Shuhei YAMANO et al., « Low total cholesterol and high total bilirubin are associated with prognosis in patients with prolonged sepsis », *in* : *Journal of critical care* 31.1 (2016), p. 36–40.
- [23] Keith R WALLEY, « Role of lipoproteins and proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 in endotoxin clearance in sepsis », *in* : *Current opinion in critical care* 22.5 (2016), p. 464–469.
- [24] Eoin FAHY et al., « A comprehensive classification system for lipids », *in* : *Journal of lipid research* 46.5 (2005), p. 839–862.
- [25] Eoin FAHY et al., « Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids », *in* : *Journal of lipid research* 50.Supplement (2009), S9–S14.
- [26] S Jonathan SINGER et Garth L NICOLSON, « The fluid mosaic model of the structure of cell membranes », *in* : *Science* 175.4023 (1972), p. 720–731.
- [27] Kai SIMONS et Gerrit VAN MEER, « Lipid sorting in epithelial cells », *in* : *Biochemistry* 27.17 (1988), p. 6197–6202.
- [28] Kai SIMONS et Elina IKONEN, « Functional rafts in cell membranes », *in* : *Nature* 387.6633 (1997), p. 569.
- [29] Kai SIMONS et Julio L SAMPAIO, « Membrane organization and lipid rafts », *in* : *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3.10 (2011), a004697.
- [30] Anita H PAYNE et Dale B HALES, « Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones », *in* : *Endocrine reviews* 25.6 (2004), p. 947–970.

-
- [31] Anika V PRABHU et al., « Cholesterol-mediated degradation of 7-dehydrocholesterol reductase switches the balance from cholesterol to vitamin D synthesis », *in* : *Journal of Biological Chemistry* 291.16 (2016), p. 8363–8373.
- [32] Matthias WACKER et Michael F HOLICK, « Sunlight and Vitamin D : A global perspective for health », *in* : *Dermato-endocrinology* 5.1 (2013), p. 51–108.
- [33] Mabel R HOKIN et Lowell E HOKIN, « Enzyme secretion and the incorporation of P32 into phospholipides of pancreas slices », *in* : *Journal of Biological Chemistry* 203.2 (1953), p. 967–977.
- [34] Yasutomi NISHIZUKA, « Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C », *in* : *Science* 258.5082 (1992), p. 607–615.
- [35] ER SMITH et al., « Effects of sphingosine and other sphingolipids on protein kinase C », *in* : *Methods in enzymology* 312 (2000), p. 361–373.
- [36] Timothy HLA, « Physiological and pathological actions of sphingosine 1-phosphate », *in* : *Seminars in cell & developmental biology*, t. 15, 5, Elsevier, 2004, p. 513–520.
- [37] Charles N SERHAN et John SAVILL, « Resolution of inflammation : the beginning programs the end », *in* : *Nature immunology* 6.12 (2005), p. 1191–1197.
- [38] Susumu MITSUTAKE et al., « Ceramide kinase is a mediator of calcium-dependent degranulation in mast cells », *in* : *Journal of Biological Chemistry* 279.17 (2004), p. 17570–17577.
- [39] Elliott Proctor JOSLIN et C Ronald KAHN, *Joslin's Diabetes Mellitus : Edited by C. Ronald Kahn...[et Al.]*. Lippincott Williams & Wilkins, 2005.
- [40] Wolf-H KUNAU, Veronika DOMMES et Horst SCHULZ, « β -Oxidation of fatty acids in mitochondria, peroxisomes, and bacteria : a century of continued progress », *in* : *Progress in lipid research* 34.4 (1995), p. 267–342.
- [41] Douglas G MASHEK et al., « Revised nomenclature for the mammalian long-chain acyl-CoA synthetase gene family », *in* : *Journal of lipid research* 45.10 (2004), p. 1958–1961.
- [42] J Denis MCGARRY et Nicholas F BROWN, « The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system—from concept to molecular analysis », *in* : *The FEBS Journal* 244.1 (1997), p. 1–14.

-
- [43] John W GOFMAN, Frank T LINDGREN et Harold ELLIOTT, « Ultracentrifugal studies of lipoproteins of human serum », *in* : *Journal of Biological Chemistry* 179.2 (1949), p. 973–979.
- [44] Richard J HAVEL, Howard A EDER et Joseph H BRAGDON, « The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum », *in* : *Journal of Clinical Investigation* 34.9 (1955), p. 1345.
- [45] Kenneth R FEINGOLD et Carl GRUNFELD, « Introduction to lipids and lipoproteins », *in* : (2015).
- [46] Monica G WILHELM et Allen D COOPER, « Induction of atherosclerosis by human chylomicron remnants : a hypothesis », *in* : *Journal of atherosclerosis and thrombosis* 10.3 (2003), p. 132–139.
- [47] H Kenneth WALKER, W Dallas HALL et J Willis HURST, « Cranial Nerves III, IV, and VI : The Oculomotor, Trochlear, and Abducens Nerves », *in* : (1990).
- [48] Ann STIKO-RAHM et al., « Native and oxidized LDL enhances production of PDGF AA and the surface expression of PDGF receptors in cultured human smooth muscle cells. », *in* : *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 12.9 (1992), p. 1099–1109.
- [49] Giuseppe MAIOLINO et al., « The role of oxidized low-density lipoproteins in atherosclerosis : the myths and the facts », *in* : *Mediators of inflammation* 2013 (2013).
- [50] Kåre BERG, « A new serum type system in man—the Lp system », *in* : *APMIS* 59.3 (1963), p. 369–382.
- [51] Joseph L WITZTUM et Henry N GINSBERG, « Lipoprotein (a) : coming of age at Last », *in* : *Journal of lipid research* 57.3 (2016), p. 336.
- [52] ME Beth SMITH et al., « Drug class review HMG-CoA reductase inhibitors (statins) and fixed-dose combination products containing a statin », *in* : *Update* (2009).
- [53] Konrad BLOCH, Benjamin N BERG, D RITTENBERG et al., « The biological conversion of cholesterol to cholic acid. », *in* : *Journal of Biological Chemistry* 149 (1943).
- [54] H DANIELSSON, K EINARSSON et G JOHANSSON, « Effect of biliary drainage on individual reactions in the conversion of cholesterol to taurocholic acid », *in* : *The FEBS Journal* 2.1 (1967), p. 44–49.

-
- [55] Margrit SCHWARZ et al., « Disruption of Cholesterol 7 α -Hydroxylase Gene in Mice II. Bile acid deficiency is overcome by induction of Oxysterol 7 α -Hydroxylase », *in* : *Journal of Biological Chemistry* 271.30 (1996), p. 18024–18031.
- [56] Shun ISHIBASHI et al., « Disruption of Cholesterol 7 α -Hydroxylase Gene in Mice I. POSTNATAL LETHALITY REVERSED BY BILE ACID AND VITAMIN SUPPLEMENTATION », *in* : *Journal of Biological Chemistry* 271.30 (1996), p. 18017–18023.
- [57] Ingemar BJÖRKHEM, « Mechanism of bile acid biosynthesis in mammalian liver », *in* : *New comprehensive biochemistry* 12 (1985), p. 231–278.
- [58] AA ANAGNOSTIDES et al., « Human pancreatic and biliary responses to physiological concentrations of cholecystokinin octapeptide », *in* : *Clinical Science* 69.3 (1985), p. 259–263.
- [59] Jens F REHFELD, « Cholecystokinin—From Local Gut Hormone to Ubiquitous Messenger », *in* : *Frontiers in endocrinology* 8 (2017).
- [60] Takeshi INAGAKI et al., « Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis », *in* : *Cell metabolism* 2.4 (2005), p. 217–225.
- [61] Konstantinos N LAZARIDIS et al., « Rat cholangiocytes absorb bile acids at their apical domain via the ileal sodium-dependent bile acid transporter. », *in* : *Journal of Clinical Investigation* 100.11 (1997), p. 2714.
- [62] Paul A DAWSON et al., « The heteromeric organic solute transporter α - β , Ost α -Ost β , is an ileal basolateral bile acid transporter », *in* : *Journal of Biological Chemistry* 280.8 (2005), p. 6960–6968.
- [63] Ezequiel NEIMARK et al., « Bile acid-induced negative feedback regulation of the human ileal bile acid transporter », *in* : *Hepatology* 40.1 (2004), p. 149–156.
- [64] Salvatore MODICA et al., « Selective activation of nuclear bile acid receptor FXR in the intestine protects mice against cholestasis », *in* : *Gastroenterology* 142.2 (2012), p. 355–365.

-
- [65] Sungsoon FANG et al., « Intestinal FXR agonism promotes adipose tissue browning and reduces obesity and insulin resistance », *in* : *Nature medicine* 21.2 (2015), p. 159–165.
- [66] Changtao JIANG et al., « Intestine-selective farnesoid X receptor inhibition improves obesity-related metabolic dysfunction », *in* : *Nature communications* 6 (2015), p. 10166.
- [67] Mohamed-Sami TRABELSI et al., « Farnesoid X receptor inhibits glucagon-like peptide-1 production by enteroendocrine L cells », *in* : *Nature communications* 6 (2015).
- [68] Konstantinos BOULIAS et al., « Regulation of hepatic metabolic pathways by the orphan nuclear receptor SHP », *in* : *The EMBO journal* 24.14 (2005), p. 2624–2633.
- [69] Hisako HIROKANE et al., « Bile acid reduces the secretion of very low density lipoprotein by repressing microsomal triglyceride transfer protein gene expression mediated by hepatocyte nuclear factor-4 », *in* : *Journal of Biological Chemistry* 279.44 (2004), p. 45685–45692.
- [70] Audrey SIRVENT et al., « The farnesoid X receptor induces very low density lipoprotein receptor gene expression », *in* : *FEBS letters* 566.1-3 (2004), p. 173–177.
- [71] Heidi Rachele KAST et al., « Farnesoid X-activated receptor induces apolipoprotein C-II transcription : a molecular mechanism linking plasma triglyceride levels to bile acids », *in* : *Molecular Endocrinology* 15.10 (2001), p. 1720–1728.
- [72] Thierry CLAUDEL et al., « Farnesoid X receptor agonists suppress hepatic apolipoprotein CIII expression », *in* : *Gastroenterology* 125.2 (2003), p. 544–555.
- [73] Mitsuhiro WATANABE et al., « Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation », *in* : *Nature* 439.7075 (2006), p. 484.
- [74] Mayuko NAKAHARA et al., « Bile acids enhance low density lipoprotein receptor gene expression via a MAPK cascade-mediated stabilization of mRNA », *in* : *Journal of Biological Chemistry* 277.40 (2002), p. 37229–37234.

-
- [75] Cédric LANGHI et al., « Activation of the farnesoid X receptor represses PCSK9 expression in human hepatocytes », *in* : *FEBS letters* 582.6 (2008), p. 949–955.
- [76] Takaharu MARUYAMA et al., « Identification of membrane-type receptor for bile acids (M-BAR) », *in* : *Biochemical and biophysical research communications* 298.5 (2002), p. 714–719.
- [77] Yuji KAWAMATA et al., « AG protein-coupled receptor responsive to bile acids », *in* : *Journal of Biological Chemistry* 278.11 (2003), p. 9435–9440.
- [78] Takaharu MARUYAMA et al., « Targeted disruption of G protein-coupled bile acid receptor 1 (Gpbar1/M-Bar) in mice », *in* : *Journal of Endocrinology* 191.1 (2006), p. 197–205.
- [79] Daniel P POOLE et al., « Expression and function of the bile acid receptor Gp-BAR1 (TGR5) in the murine enteric nervous system », *in* : *Neurogastroenterology & Motility* 22.7 (2010), p. 814.
- [80] Hui ZHOU et al., « Upregulation of bile acid receptor TGR5 and nNOS in gastric myenteric plexus is responsible for delayed gastric emptying after chronic high-fat feeding in rats », *in* : *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 308.10 (2015), G863–G873.
- [81] Vanitha BALA et al., « Release of GLP-1 and PYY in response to the activation of G protein-coupled bile acid receptor TGR5 is mediated by Epac/PLC- ϵ pathway and modulated by endogenous H₂S », *in* : *Frontiers in physiology* 5 (2014).
- [82] Murielle MJ COMBETTES, « GLP-1 and type 2 diabetes : physiology and new clinical advances », *in* : *Current opinion in pharmacology* 6.6 (2006), p. 598–605.
- [83] J HSIEH et al., « The glucagon-like peptide 1 receptor is essential for postprandial lipoprotein synthesis and secretion in hamsters and mice », *in* : *Diabetologia* 53.3 (2010), p. 552–561.
- [84] Abdella M HABIB et al., « Overlap of endocrine hormone expression in the mouse intestine revealed by transcriptional profiling and flow cytometry », *in* : *Endocrinology* 153.7 (2012), p. 3054–3065.

-
- [85] AP SAVAGE et al., « Effects of peptide YY (PYY) on mouth to caecum intestinal transit time and on the rate of gastric emptying in healthy volunteers. », *in* : *Gut* 28.2 (1987), p. 166–170.
- [86] Ursula HANUSCH-ENSERER et al., « Relation of fasting plasma peptide YY to glucose metabolism and cardiovascular risk factors after restrictive bariatric surgery », *in* : *Wiener klinische Wochenschrift* 119.9 (2007), p. 291–296.
- [87] Farrell CAHILL et al., « Serum peptide YY in response to short-term overfeeding in young men », *in* : *The American journal of clinical nutrition* 93.4 (2011), p. 741–747.
- [88] Emilie GRENIER et al., « Modulatory role of PYY in transport and metabolism of cholesterol in intestinal epithelial cells », *in* : *PloS one* 7.7 (2012), e40992.
- [89] Nabil G SEIDAH et al., « The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1) : liver regeneration and neuronal differentiation », *in* : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100.3 (2003), p. 928–933.
- [90] Marianne ABIFADEL et al., « Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia », *in* : *Nature genetics* 34.2 (2003), p. 154–156.
- [91] Jacqueline S DRON et Robert A HEGELE, « Genetics of lipid and lipoprotein disorders and traits », *in* : *Current genetic medicine reports* 4.3 (2016), p. 130–141.
- [92] Kara N MAXWELL et Jan L BRESLOW, « Adenoviral-mediated expression of Pcsk9 in mice results in a low-density lipoprotein receptor knockout phenotype », *in* : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101.18 (2004), p. 7100–7105.
- [93] Bertrand CARIOU, Karim SI-TAYEB et Cédric LE MAY, « Role of PCSK9 beyond liver involvement », *in* : *Current opinion in lipidology* 26.3 (2015), p. 155–161.
- [94] Shirya RASHID et al., « Decreased plasma cholesterol and hypersensitivity to statins in mice lacking Pcsk9 », *in* : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102.15 (2005), p. 5374–5379.
- [95] Dirk J BLOM et al., « A 52-week placebo-controlled trial of evolocumab in hyperlipidemia », *in* : *New England Journal of Medicine* 370.19 (2014), p. 1809–1819.

-
- [96] Susan G LAKOSKI et al., « Genetic and metabolic determinants of plasma PCSK9 levels », *in* : *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 94.7 (2009), p. 2537–2543.
- [97] Bertrand CARIOU et al., « Plasma PCSK9 concentrations during an oral fat load and after short term high-fat, high-fat high-protein and high-fructose diets », *in* : *Nutrition & metabolism* 10.1 (2013), p. 4.
- [98] Benoit J ARSENAULT et al., « PCSK9 levels in abdominally obese men : association with cardiometabolic risk profile and effects of a one-year lifestyle modification program », *in* : *Atherosclerosis* 236.2 (2014), p. 321–326.
- [99] Miriam CNOP et al., « Low density lipoprotein can cause death of islet β -cells by its cellular uptake and oxidative modification », *in* : *Endocrinology* 143.9 (2002), p. 3449–3453.
- [100] Mingming HAO et al., « Direct effect of cholesterol on insulin secretion », *in* : *Diabetes* 56.9 (2007), p. 2328–2338.
- [101] Cédric LANGHI et al., « PCSK9 is expressed in pancreatic δ -cells and does not alter insulin secretion », *in* : *Biochemical and biophysical research communications* 390.4 (2009), p. 1288–1293.
- [102] Vikas SHAROTRI et al., « Regulation of epithelial sodium channel trafficking by proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) », *in* : *Journal of Biological Chemistry* 287.23 (2012), p. 19266–19274.
- [103] Rama SOUNDARARAJAN et al., « Role of epithelial sodium channels and their regulators in hypertension », *in* : *Journal of Biological Chemistry* 285.40 (2010), p. 30363–30369.
- [104] Jean-Mathieu BERGER et al., « PCSK9-deficiency does not alter blood pressure and sodium balance in mouse models of hypertension », *in* : *Atherosclerosis* 239.1 (2015), p. 252–259.
- [105] Nicola FERRI et al., « Proprotein convertase subtilisin kexin type 9 (PCSK9) secreted by cultured smooth muscle cells reduces macrophages LDLR levels », *in* : *Atherosclerosis* 220.2 (2012), p. 381–386.

-
- [106] Zufeng DING et al., « Hemodynamic shear stress via ROS modulates PCSK9 expression in human vascular endothelial and smooth muscle cells and along the mouse aorta », *in* : *Antioxidants & redox signaling* 22.9 (2015), p. 760–771.
- [107] Matthew J BOTTOMLEY et al., « Structural and biochemical characterization of the wild type PCSK9-EGF (AB) complex and natural familial hypercholesterolemia mutants », *in* : *Journal of Biological Chemistry* 284.2 (2009), p. 1313–1323.
- [108] Hyock Joo KWON et al., « Molecular basis for LDL receptor recognition by PCSK9 », *in* : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105.6 (2008), p. 1820–1825.
- [109] David CUNNINGHAM et al., « Structural and biophysical studies of PCSK9 and its mutants linked to familial hypercholesterolemia », *in* : *Nature structural & molecular biology* 14.5 (2007), p. 413.
- [110] Suzanne BENJANNET et al., « NARC-1/PCSK9 and its natural mutants zymogen cleavage and effects on the low density lipoprotein (LDL) receptor and LDL cholesterol », *in* : *Journal of Biological Chemistry* 279.47 (2004), p. 48865–48875.
- [111] Fen DU et al., « Novel domain interaction regulates secretion of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) protein », *in* : *Journal of Biological Chemistry* 286.50 (2011), p. 43054–43061.
- [112] Xiao-Wei CHEN et al., « SEC24A deficiency lowers plasma cholesterol through reduced PCSK9 secretion », *in* : *Elife* 2 (2013), e00444.
- [113] Rosalind KORNFELD et Stuart KORNFELD, « Assembly of asparagine-linked oligosaccharides », *in* : *Annual review of biochemistry* 54.1 (1985), p. 631–664.
- [114] Thilina DEWPURA et al., « PCSK9 is phosphorylated by a Golgi casein kinase-like kinase ex vivo and circulates as a phosphoprotein in humans », *in* : *The FEBS journal* 275.13 (2008), p. 3480–3493.
- [115] Vincent S TAGLIABRACCI et al., « A single kinase generates the majority of the secreted phosphoproteome », *in* : *Cell* 161.7 (2015), p. 1619–1632.
- [116] Suzanne BENJANNET et al., « The proprotein convertase (PC) PCSK9 is inactivated by furin and/or PC5/6A functional consequences of natural mutations and post-translational modifications », *in* : *Journal of Biological Chemistry* 281.41 (2006), p. 30561–30572.

-
- [117] Thomas A LAGACE, « PCSK9 and LDLR degradation : regulatory mechanisms in circulation and in cells », *in* : *Current opinion in lipidology* 25.5 (2014), p. 387.
- [118] Gaétan MAYER et al., « The regulated cell surface zymogen activation of the pro-protein convertase PC5A directs the processing of its secretory substrates », *in* : *Journal of Biological Chemistry* 283.4 (2008), p. 2373–2384.
- [119] Da-Wei ZHANG et al., « Binding of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 to epidermal growth factor-like repeat A of low density lipoprotein receptor decreases receptor recycling and increases degradation », *in* : *Journal of Biological Chemistry* 282.25 (2007), p. 18602–18612.
- [120] Timothy S FISHER et al., « Effects of pH and low density lipoprotein (LDL) on PCSK9-dependent LDL receptor regulation », *in* : *Journal of Biological Chemistry* 282.28 (2007), p. 20502–20512.
- [121] Paola Lo SURDO et al., « Mechanistic implications for LDL receptor degradation from the PCSK9/LDLR structure at neutral pH », *in* : *EMBO reports* 12.12 (2011), p. 1300–1305.
- [122] Sha HUANG et al., « Mechanism of LDL binding and release probed by structure-based mutagenesis of the LDL receptor », *in* : *Journal of lipid research* 51.2 (2010), p. 297–308.
- [123] Nasha NASSOURY et al., « The cellular trafficking of the secretory proprotein convertase PCSK9 and its dependence on the LDLR », *in* : *Traffic* 8.6 (2007), p. 718–732.
- [124] Steve POIRIER et al., « Dissection of the endogenous cellular pathways of PCSK9-induced low density lipoprotein receptor degradation evidence for an intracellular route », *in* : *Journal of Biological Chemistry* 284.42 (2009), p. 28856–28864.
- [125] Jamie CAMERON et al., « Effect of mutations in the PCSK9 gene on the cell surface LDL receptors », *in* : *Human molecular genetics* 15.9 (2006), p. 1551–1558.
- [126] YG LUNA SAAVEDRA, R DAY et NG SEIDAH, « The M2 module of the Cys-His-rich domain (CHRD) of PCSK9 is needed for the extracellular low density lipoprotein receptor (LDLR) degradation pathway », *in* : *J Biol Chem* 287 (2012), p. 43492–501.

-
- [127] Steve POIRIER et al., « Trafficking dynamics of PCSK9-induced LDLR degradation : focus on human PCSK9 mutations and C-terminal domain », *in : PloS one* 11.6 (2016), e0157230.
- [128] Jacqueline S DRON et Robert A HEGELE, « Complexity of mechanisms among human proprotein convertase subtilisin–kexin type 9 variants », *in : Current opinion in lipidology* 28.2 (2017), p. 161–169.
- [129] Jonathan COHEN et al., « Low LDL cholesterol in individuals of African descent resulting from frequent nonsense mutations in PCSK9 », *in : Nature genetics* 37.2 (2005), p. 161.
- [130] Jonathan C COHEN et al., « Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease », *in : New England Journal of Medicine* 354.12 (2006), p. 1264–1272.
- [131] Nabil G SEIDAH et al., « PCSK9 », *in : Circulation research* 114.6 (2014), p. 1022–1036.
- [132] Marianne ABIFADEL et al., « Mutations and polymorphisms in the proprotein convertase subtilisin kexin 9 (PCSK9) gene in cholesterol metabolism and disease », *in : Human mutation* 30.4 (2009), p. 520–529.
- [133] Suzanne BENJANNET et al., « Loss-and gain-of-function PCSK9 variants cleavage specificity, dominant negative effects, and low density lipoprotein receptor (ldlr) degradation », *in : Journal of Biological Chemistry* 287.40 (2012), p. 33745–33755.
- [134] Nathalie BERGERON et al., « Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 Inhibition », *in : Circulation* 132.17 (2015), p. 1648–1666.
- [135] Marianne ABIFADEL et al., « Identification and characterization of new gain-of-function mutations in the PCSK9 gene responsible for autosomal dominant hypercholesterolemia », *in : Atherosclerosis* 223.2 (2012), p. 394–400.
- [136] Marianne ABIFADEL et al., « Living the PCSK9 adventure : from the identification of a new gene in familial hypercholesterolemia towards a potential new class of anticholesterol drugs », *in : Current atherosclerosis reports* 16.9 (2014), p. 439.
- [137] James LATIMER et al., « PCSK9 inhibitors in the prevention of cardiovascular disease », *in : Journal of thrombosis and thrombolysis* 42.3 (2016), p. 405–419.

-
- [138] Sanjiv GUPTA, « Development of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 inhibitors and the clinical potential of monoclonal antibodies in the management of lipid disorders », *in : Vascular health and risk management* 12 (2016), p. 421.
- [139] Nathan D WONG, Paul D ROSENBLIT et Robert S GREENFIELD, « Advances in dyslipidemia management for prevention of atherosclerosis : PCSK9 monoclonal antibody therapy and beyond », *in : Cardiovascular diagnosis and therapy* 7.Suppl 1 (2017), S11.
- [140] Gergana GALABOVA et al., « Peptide-based anti-PCSK9 vaccines-an approach for long-term LDLc management », *in : PLoS One* 9.12 (2014), e114469.
- [141] Tracy MITCHELL et al., « Pharmacologic profile of the Adnectin BMS-962476, a small protein biologic alternative to PCSK9 antibodies for low-density lipoprotein lowering », *in : Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 350.2 (2014), p. 412–424.
- [142] LiXin SHAN et al., « PCSK9 binds to multiple receptors and can be functionally inhibited by an EGF-A peptide », *in : Biochemical and biophysical research communications* 375.1 (2008), p. 69–73.
- [143] Evan A STEIN et al., « LDL cholesterol reduction with BMS-962476, an adnectin inhibitor of PCSK9 : results of a single ascending dose study », *in : J Am Coll Cardiol* 63.12 Suppl (2014), A172.
- [144] Mark J GRAHAM et al., « Antisense inhibition of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 reduces serum LDL in hyperlipidemic mice », *in : Journal of lipid research* 48.4 (2007), p. 763–767.
- [145] Maria FRANK-KAMENETSKY et al., « Therapeutic RNAi targeting PCSK9 acutely lowers plasma cholesterol in rodents and LDL cholesterol in nonhuman primates », *in : Proceedings of the National Academy of Sciences* 105.33 (2008), p. 11915–11920.
- [146] Nidhi GUPTA et al., « A locked nucleic acid antisense oligonucleotide (LNA) silences PCSK9 and enhances LDLR expression in vitro and in vivo », *in : PloS one* 5.5 (2010), e10682.
- [147] F Ann RAN et al., « In vivo genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9 », *in : Nature* 520.7546 (2015), p. 186–191.

-
- [148] Hai LI et al., « Hepatocyte nuclear factor 1 α plays a critical role in PCSK9 gene transcription and regulation by the natural hypocholesterolemic compound berberine », *in* : *Journal of Biological Chemistry* 284.42 (2009), p. 28885–28895.
- [149] Philippe COSTET et al., « Hepatic PCSK9 expression is regulated by nutritional status via insulin and sterol regulatory element-binding protein 1c », *in* : *Journal of Biological Chemistry* 281.10 (2006), p. 6211–6218.
- [150] Els DE SMET et al., « Acute intake of plant stanol esters induces changes in lipid and lipoprotein metabolism-related gene expression in the liver and intestines of mice », *in* : *Lipids* 50.6 (2015), p. 529–541.
- [151] Minna T JÄNIS et al., « Beyond LDL-C lowering : distinct molecular sphingolipids are good indicators of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) deficiency », *in* : *Atherosclerosis* 228.2 (2013), p. 380–385.
- [152] Weerapan KHOVIDHUNKIT et al., « Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism : mechanisms and consequences to the host », *in* : *The Journal of Lipid Research* 45.7 (2004), p. 1169–1196.
- [153] Kenneth R FEINGOLD et al., « Inflammation stimulates the expression of PCSK9 », *in* : *Biochemical and biophysical research communications* 374.2 (2008), p. 341–344.
- [154] ROBERT L MASON, Hazel M HUNT et Lewis HURXTHAL, « Blood cholesterol values in hyperthyroidism and hypothyroidism—their significance », *in* : *New England Journal of Medicine* 203.26 (1930), p. 1273–1278.
- [155] Gene C NESS et al., « Effect of thyroid hormone on hepatic cholesterol 7 α hydroxylase, LDL receptor, HMG-CoA reductase, farnesyl pyrophosphate synthetase and apolipoprotein AI mRNA levels in hypophysectomized rats », *in* : *Biochemical and biophysical research communications* 172.3 (1990), p. 1150–1156.
- [156] Dong-Ju SHIN et Timothy F OSBORNE, « Thyroid hormone regulation and cholesterol metabolism are connected through sterol regulatory element-binding protein-2 (SREBP-2) », *in* : *Journal of Biological Chemistry* 278.36 (2003), p. 34114–34118.
- [157] Ylva BONDE et al., « Thyroid hormone reduces PCSK9 and stimulates bile acid synthesis in humans », *in* : *Journal of lipid research* 55.11 (2014), p. 2408–2415.

-
- [158] Moumita GHOSH et al., « Influence of physiological changes in endogenous estrogen on circulating PCSK9 and LDL cholesterol », *in : Journal of lipid research* 56.2 (2015), p. 463–469.
- [159] Lena PERSSON et al., « Endogenous estrogens lower plasma PCSK9 and LDL cholesterol but not Lp (a) or bile acid synthesis in women », *in : Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 32.3 (2012), p. 810–814.
- [160] James DEGREGORI, Timothy KOWALIK et Joseph R NEVINS, « Cellular targets for activation by the E2F1 transcription factor include DNA synthesis-and G1/S-regulatory genes. », *in : Molecular and cellular biology* 15.8 (1995), p. 4215–4224.
- [161] Qiuwen LAI et al., « E2F1 inhibits circulating cholesterol clearance by regulating Pcsk9 expression in the liver », *in : JCI insight* 2.10 (2017).
- [162] Pierre-Damien DENECHAUD et al., « E2F1 mediates sustained lipogenesis and contributes to hepatic steatosis », *in : The Journal of clinical investigation* 126.1 (2016), p. 137.
- [163] Genevieve DUBUC et al., « Statins upregulate PCSK9, the gene encoding the proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase-1 implicated in familial hypercholesterolemia », *in : Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 24.8 (2004), p. 1454–1459.
- [164] Hyun Jeong JEONG et al., « Sterol-dependent regulation of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 expression by sterol-regulatory element binding protein-2 », *in : Journal of lipid research* 49.2 (2008), p. 399–409.
- [165] Nicola FERRI et al., « Geranylgeraniol prevents the simvastatin-induced PCSK9 expression : role of the small G protein Rac1 », *in : Pharmacological Research* (2017).
- [166] Bart STAELS et Jean-Charles FRUCHART, « Therapeutic roles of peroxisome proliferator-activated receptor agonists », *in : Diabetes* 54.8 (2005), p. 2460–2470.
- [167] Jean-Charles FRUCHART, « Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPAR α) : at the crossroads of obesity, diabetes and cardiovascular disease », *in : Atherosclerosis* 205.1 (2009), p. 1–8.

-
- [168] Sanae KOURIMATE et al., « Dual mechanisms for the fibrate-mediated repression of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 », *in* : *Journal of Biological Chemistry* 283.15 (2008), p. 9666–9673.
- [169] Bart STAELS et Vivian A FONSECA, « Bile acids and metabolic regulation », *in* : *Diabetes care* 32.suppl 2 (2009), S237–S245.
- [170] M GHOSH LASKAR et al., « Treatment with the natural FXR agonist chenodeoxycholic acid reduces clearance of plasma LDL whilst decreasing circulating PCSK9, lipoprotein (a) and apolipoprotein C-III », *in* : *Journal of Internal Medicine* 281.6 (2017), p. 575–585.
- [171] Jamie CAMERON et al., « Berberine decreases PCSK9 expression in HepG2 cells », *in* : *Atherosclerosis* 201.2 (2008), p. 266–273.
- [172] Bin DONG et al., « Inhibition of PCSK9 transcription by berberine involves down-regulation of hepatic HNF1 α protein expression through the ubiquitin-proteasome degradation pathway », *in* : *Journal of Biological Chemistry* 290.7 (2015), p. 4047–4058.
- [173] De-liang LIU et al., « Inhibition of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 : a novel mechanism of berberine and 8-hydroxy dihydroberberine against hyperlipidemia », *in* : *Chinese journal of integrative medicine* 21.2 (2015), p. 132–138.
- [174] Hong-Bo XIAO et al., « Berberine inhibits dyslipidemia in C57BL/6 mice with lipopolysaccharide induced inflammation », *in* : *Pharmacological Reports* 64.4 (2012), p. 889–895.
- [175] Purusotam BASNET et Natasa SKALKO-BASNET, « Curcumin : an anti-inflammatory molecule from a curry spice on the path to cancer treatment », *in* : *Molecules* 16.6 (2011), p. 4567–4598.
- [176] Mi-Hsueh TAI et al., « Curcumin enhances cell-surface LDLR level and promotes LDL uptake through downregulation of PCSK9 gene expression in HepG2 cells », *in* : *Molecular nutrition & food research* 58.11 (2014), p. 2133–2145.
- [177] Wei-Wei XING et al., « Effects of polydatin from *Polygonum cuspidatum* on lipid profile in hyperlipidemic rabbits », *in* : *Biomedicine & Pharmacotherapy* 63.7 (2009), p. 457–462.

-
- [178] Elena TOPCHIV et al., « Lipopolysaccharide is cleared from the circulation by hepatocytes via the low density lipoprotein receptor », *in* : *PloS one* 11.5 (2016), e0155030.
- [179] Herbert F HELANDER et Lars FÄNDRIS, « Surface area of the digestive tract—revisited », *in* : *Scandinavian journal of gastroenterology* 49.6 (2014), p. 681–689.
- [180] Rao N JALADANKI et Jian-Ying WANG, « Regulation of gastrointestinal mucosal growth », *in* : *Colloquium Series on Integrated Systems Physiology : From Molecule to Function*, t. 3, 2, Morgan & Claypool Life Sciences, 2011, p. 1–114.
- [181] JM WILLIAMS et al., « Epithelial cell shedding and barrier function : a matter of life and death at the small intestinal villus tip », *in* : *Veterinary pathology* 52.3 (2015), p. 445–455.
- [182] Matthew BJERKNES et Hazel CHENG, « Clonal analysis of mouse intestinal epithelial progenitors », *in* : *Gastroenterology* 116.1 (1999), p. 7–14.
- [183] Hua TIAN et al., « A reserve stem cell population in small intestine renders Lgr5-positive cells dispensable », *in* : *Nature* 478.7368 (2011), p. 255.
- [184] Nick BARKER et al., « Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5 », *in* : *Nature* 449.7165 (2007), p. 1003–1007.
- [185] Kyle C ROCHE et al., « SOX9 maintains reserve stem cells and preserves radioresistance in mouse small intestine », *in* : *Gastroenterology* 149.6 (2015), p. 1553–1563.
- [186] Eugenio SANGIORGI et Mario R CAPECCHI, « Bmi1 is expressed in vivo in intestinal stem cells », *in* : *Nature genetics* 40.7 (2008), p. 915–920.
- [187] Hazel CHENG et CP LEBLOND, « Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine I. Columnar cell », *in* : *Developmental Dynamics* 141.4 (1974), p. 461–479.
- [188] Sherif M KARAM, « Lineage commitment and maturation of epithelial cells in the gut », *in* : *Front Biosci* 4.1 (1999), p. D286–298.
- [189] Susan E SCHONHOFF, Maryann GIEL-MOLONEY et Andrew B LEITER, « Minireview : Development and differentiation of gut endocrine cells », *in* : *Endocrinology* 145.6 (2004), p. 2639–2644.

-
- [190] Maja S ENGELSTOFT et al., « Enteroendocrine cell types revisited », *in* : *Current opinion in pharmacology* 13.6 (2013), p. 912–921.
- [191] Jahangir IQBAL et M Mahmood HUSSAIN, « Intestinal lipid absorption », *in* : *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 296.6 (2009), E1183–E1194.
- [192] B ÅKESSON et al., « Absorption of synthetic, stereochemically defined acylglycerols in the rat », *in* : *Lipids* 13.5 (1978), p. 338–343.
- [193] Jeffrey S COHN et al., « Dietary phospholipids and intestinal cholesterol absorption », *in* : *Nutrients* 2.2 (2010), p. 116–127.
- [194] John L WEIHRAUCH et Young-Sun SON, « Phospholipid content of foods », *in* : *Journal of the American Oil Chemists' Society* 60.12 (1983), p. 1971–1978.
- [195] H VAN DEN BOSCH et LLM VAN DEENEN, « Chemical structure and biochemical significance of lysolecithins from rat liver », *in* : *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism* 106.2 (1965), p. 326–337.
- [196] Bo ARNESJÖ, « Intracellular distribution of phospholipases in the rat pancreas », *in* : *Acta Physiologica* 81.2 (1971), p. 170–175.
- [197] Scott M GRUNDY, « Absorption and metabolism of dietary cholesterol », *in* : *Annual review of nutrition* 3.1 (1983), p. 71–96.
- [198] JM DIETSCHY, VL SALLEE et FA WILSON, « Unstirred water layers and absorption across the intestinal mucosa. », *in* : *Gastroenterology* 61.6 (1971), p. 932.
- [199] Henrik WESTERGAARD et John M DIETSCHY, « The mechanism whereby bile acid micelles increase the rate of fatty acid and cholesterol uptake into the intestinal mucosal cell. », *in* : *Journal of Clinical Investigation* 58.1 (1976), p. 97.
- [200] NE HOFFMAN et VJ YEOH, « The relationship between concentration and uptake by rat small intestine, in vitro, for two micellar solutes », *in* : *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 233.1 (1971), p. 49–52.
- [201] John Howard MUELLER, « The mechanism of cholesterol absorption », *in* : *J. biol. Chem* 22 (1916).
- [202] WJ SIMMONDS, « The role of micellar solubilization in lipid absorption », *in* : *Aust J Exp Biol Med Sci* 50.4 (1972), p. 403–21.

-
- [203] MD SIPERSTEIN, IL CHAIKOFF, WO REINHARDT et al., « C14-Cholesterol. 5. Obligatory function of bile in intestinal absorption of cholesterol. », *in* : *Journal of Biological Chemistry* 198 (1952), p. 111–114.
- [204] Shirley M WATT et Wilfred J SIMMONDS, « The specificity of bile salts in the intestinal absorption of micellar cholesterol in the rat », *in* : *Clinical And Experimental Pharmacology And Physiology* 3.4 (1976), p. 305–322.
- [205] Leon SWELL et al., « Influence of dietary bile salts on blood cholesterol levels », *in* : *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 84.2 (1953), p. 428–431.
- [206] Hugo E GALLO-TORRES, O Neal MILLER et James G HAMILTON, « Further studies on the role of bile salts in cholesterol esterification and absorption from the gut », *in* : *Archives of biochemistry and biophysics* 143.1 (1971), p. 22–36.
- [207] Nada A ABUMRAD et al., « Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36. », *in* : *Journal of Biological Chemistry* 268.24 (1993), p. 17665–17668.
- [208] Azeddine IBRAHIMI et al., « Muscle-specific overexpression of FAT/CD36 enhances fatty acid oxidation by contracting muscle, reduces plasma triglycerides and fatty acids, and increases plasma glucose and insulin », *in* : *Journal of Biological Chemistry* 274.38 (1999), p. 26761–26766.
- [209] Ken-ichi HIRANO et al., « Pathophysiology of human genetic CD36 deficiency », *in* : *Trends in cardiovascular medicine* 13.4 (2003), p. 136–141.
- [210] Kenichi WATANABE et al., « Myocardial CD36 expression and fatty acid accumulation in patients with type I and II CD36 deficiency », *in* : *Annals of nuclear medicine* 12.5 (1998), p. 261–266.
- [211] Shizuya YAMASHITA et al., « Physiological and pathological roles of a multi-ligand receptor CD36 in atherogenesis; insights from CD36-deficient patients », *in* : *Molecular and cellular biochemistry* 299.1 (2007), p. 19–22.
- [212] Chris T COBURN et al., « Defective uptake and utilization of long chain fatty acids in muscle and adipose tissues of CD36 knockout mice », *in* : *Journal of Biological Chemistry* 275.42 (2000), p. 32523–32529.

-
- [213] Tahar HAJRI et al., « Defective fatty acid uptake modulates insulin responsiveness and metabolic responses to diet in CD36-null mice », *in : The Journal of clinical investigation* 109.10 (2002), p. 1381.
- [214] MV LOBO et al., « Localization of <http://ajpendo.physiology.org/>Downloaded from the lipid receptors CD36 and CLA-1/SR-BI in the human gastrointestinal tract : towards the identification of receptors mediating the intestinal absorption of dietary lipids », *in : J Histochem Cytochem* 49 (2001), p. 1253–1260.
- [215] Fatiha NASSIR et al., « CD36 is important for fatty acid and cholesterol uptake by the proximal but not distal intestine », *in : Journal of Biological Chemistry* 282.27 (2007), p. 19493–19501.
- [216] Helene POIRIER et al., « Localization and regulation of the putative membrane Fatty-Acid transporter (FAT) in the small intestine », *in : The FEBS Journal* 238.2 (1996), p. 368–373.
- [217] Jeltje R GOUDRIAAN et al., « Intestinal lipid absorption is not affected in CD36 deficient mice », *in : Molecular and cellular biochemistry* 239.1 (2002), p. 199–202.
- [218] Victor A DROVER et al., « CD36 deficiency impairs intestinal lipid secretion and clearance of chylomicrons from the blood », *in : Journal of Clinical Investigation* 115.5 (2005), p. 1290.
- [219] Andromeda M NAULI et al., « CD36 is important for chylomicron formation and secretion and may mediate cholesterol uptake in the proximal intestine », *in : Gastroenterology* 131.4 (2006), p. 1197–1207.
- [220] Andreas STAHL et al., « Identification of the major intestinal fatty acid transport protein », *in : Molecular cell* 4.3 (1999), p. 299–308.
- [221] Jien SHIM et al., « Fatty acid transport protein 4 is dispensable for intestinal lipid absorption in mice », *in : Journal of lipid research* 50.3 (2009), p. 491–500.
- [222] S GUILMEAU et al., « Decreased expression of Intestinal I-and L-FABP levels in rare human genetic lipid malabsorption syndromes », *in : Histochemistry and cell biology* 128.2 (2007), p. 115–123.

-
- [223] Emile LEVY et al., « Localization, function and regulation of the two intestinal fatty acid-binding protein types », *in* : *Histochemistry and cell biology* 132.3 (2009), p. 351–367.
- [224] Maurice MAL PELSERS et al., « Intestinal-type and liver-type fatty acid-binding protein in the intestine. Tissue distribution and clinical utility », *in* : *Clinical biochemistry* 36.7 (2003), p. 529–535.
- [225] Luis B AGELLON, Matthew J TOTH et Alan BR THOMSON, « Intracellular lipid binding proteins of the small intestine », *in* : *Molecular and cellular biochemistry* 239.1-2 (2002), p. 79–82.
- [226] JC SACCHETTINI et al., « Developmental and structural studies of an intracellular lipid binding protein expressed in the ileal epithelium. », *in* : *Journal of Biological Chemistry* 265.31 (1990), p. 19199–19207.
- [227] Judith STORCH et Betina CORSICO, « The emerging functions and mechanisms of mammalian fatty acid-binding proteins », *in* : *Annu. Rev. Nutr.* 28 (2008), p. 73–95.
- [228] DH ALPERS et al., « Intestinal fatty acid binding protein may favor differential apical fatty acid binding in the intestine », *in* : *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* 1483.3 (2000), p. 352–362.
- [229] Angela M GAJDA et Judith STORCH, « Enterocyte fatty acid-binding proteins (FABPs) : different functions of liver and intestinal FABPs in the intestine », *in* : *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)* 93 (2015), p. 9–16.
- [230] Elliott W STRAUSS, « Electron microscopic study of intestinal fat absorption in vitro from mixed micelles containing linolenic acid, monoolein, and bile salt », *in* : *Journal of lipid research* 7.2 (1966), p. 307–323.
- [231] John M JOHNSTON et Bengt BORSTRÖM, « The intestinal absorption and metabolism of micellar solutions of lipids », *in* : *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Specialized Section on Lipids and Related Subjects* 84.4 (1964), p. 412–423.
- [232] Pamela J TROTTER, Shiu Ying HO et J STORCH, « Fatty acid uptake by Caco-2 human intestinal cells. », *in* : *Journal of lipid research* 37.2 (1996), p. 336–346.

-
- [233] SL CHOW et D HOLLANDER, « Linoleic acid absorption in the unaesthetized rat : mechanism of transport and influence of luminal factors on absorption », *in* : *Lipids* 14.4 (1979), p. 378–385.
- [234] G SCHULTHESS et al., « Absorption of monoacylglycerols by small intestinal brush border membrane », *in* : *Biochemistry* 33.15 (1994), p. 4500–4508.
- [235] Kaeko MUROTA et al., « Inhibitory effect of monoacylglycerol on fatty acid uptake into rat intestinal epithelial cells », *in* : *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 65.6 (2001), p. 1441–1443.
- [236] Kaeko MUROTA et Judith STORCH, « Uptake of micellar long-chain fatty acid and sn-2-monoacylglycerol into human intestinal Caco-2 cells exhibits characteristics of protein-mediated transport », *in* : *The Journal of nutrition* 135.7 (2005), p. 1626–1630.
- [237] William S LAGAKOS et al., « Liver fatty acid-binding protein binds monoacylglycerol in vitro and in mouse liver cytosol », *in* : *Journal of Biological Chemistry* 288.27 (2013), p. 19805–19815.
- [238] Piero PORTINCASA et David Q-H WANG, « Intestinal absorption, hepatic synthesis, and biliary secretion of cholesterol : where are we for cholesterol gallstone formation? », *in* : *Hepatology* 55.5 (2012), p. 1313–1316.
- [239] Claire BLANCHARD et al., « Trans-intestinal cholesterol excretion (TICE) : A new route for cholesterol excretion », *in* : *Medecine sciences : M/S* 30.10 (2014), p. 896–901.
- [240] Gerald SALEN, EH AHRENS JR et Scott M GRUNDY, « Metabolism of β -sitosterol in man », *in* : *Journal of Clinical Investigation* 49.5 (1970), p. 952.
- [241] Liqing YU et al., « Overexpression of ABCG5 and ABCG8 promotes biliary cholesterol secretion and reduces fractional absorption of dietary cholesterol », *in* : *The Journal of clinical investigation* 110.5 (2002), p. 671.
- [242] Fred KERN JR, « Normal plasma cholesterol in an 88-year-old man who eats 25 eggs a day : mechanisms of adaptation », *in* : *New England Journal of Medicine* 324.13 (1991), p. 896–899.

-
- [243] LY YANG et al., « Origin of triacylglycerol moiety of plasma very low density lipoproteins in the rat : structural studies. », *in* : *Journal of lipid research* 36.1 (1995), p. 125–136.
- [244] Lihang YAO et al., « Separation of micelles and vesicles within luminal aspirates from healthy humans : solubilization of cholesterol after a meal », *in* : *Journal of lipid research* 43.4 (2002), p. 654–660.
- [245] Scott W ALTMANN et al., « Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption », *in* : *Science* 303.5661 (2004), p. 1201–1204.
- [246] Mi-Hye LEE et al., « Identification of a gene, ABCG5, important in the regulation of dietary cholesterol absorption », *in* : *Nature genetics* 27.1 (2001), p. 79.
- [247] Knut E BERGE et al., « Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters », *in* : *Science* 290.5497 (2000), p. 1771–1775.
- [248] Kangmo LU et al., « Two genes that map to the STSL locus cause sitosterolemia : genomic structure and spectrum of mutations involving sterolin-1 and sterolin-2, encoded by ABCG5 and ABCG8, respectively », *in* : *The American Journal of Human Genetics* 69.2 (2001), p. 278–290.
- [249] Margarita GARCIA-CALVO et al., « The target of ezetimibe is Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1) », *in* : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102.23 (2005), p. 8132–8137.
- [250] Joanna P DAVIES, Brynn LEVY et Yiannis A IOANNOU, « Evidence for a Niemann-Pick C (NPC) gene family : identification and characterization of NPC1L1 », *in* : *Genomics* 65.2 (2000), p. 137–145.
- [251] Jiang WANG et al., « Membrane topology of human NPC1L1, a key protein in enterohepatic cholesterol absorption », *in* : *Journal of lipid research* 50.8 (2009), p. 1653–1662.
- [252] Sai Prasad N IYER et al., « Characterization of the putative native and recombinant rat sterol transporter Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) protein », *in* : *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1722.3 (2005), p. 282–292.

-
- [253] Joanna P DAVIES, Fannie W CHEN et Yiannis A IOANNOU, « Transmembrane molecular pump activity of Niemann-Pick C1 protein », *in* : *Science* 290.5500 (2000), p. 2295–2298.
- [254] Liqing YU et al., « Cholesterol-regulated translocation of NPC1L1 to the cell surface facilitates free cholesterol uptake », *in* : *Journal of Biological Chemistry* 281.10 (2006), p. 6616–6624.
- [255] Ryan E TEMEL et al., « Hepatic Niemann-Pick C1-like 1 regulates biliary cholesterol concentration and is a target of ezetimibe », *in* : *Journal of clinical investigation* 117.7 (2007), p. 1968.
- [256] Stuart B ROSENBLUM et al., *Hydroxy-substituted azetidinone compounds useful as hypocholesterolemic agents*, US Patent 5,767,115, juin 1998.
- [257] Harry R DAVIS et al., « Ezetimibe, a potent cholesterol absorption inhibitor, inhibits the development of atherosclerosis in ApoE knockout mice », *in* : *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 21.12 (2001), p. 2032–2038.
- [258] Thomas SUDHOP et al., « Inhibition of intestinal cholesterol absorption by ezetimibe in humans », *in* : *Circulation* 106.15 (2002), p. 1943–1948.
- [259] Harold E BAYS et al., « Effectiveness and tolerability of ezetimibe in patients with primary hypercholesterolemia : pooled analysis of two phase II studies », *in* : *Clinical therapeutics* 23.8 (2001), p. 1209–1230.
- [260] Carlos A DUJOVNE et al., « Efficacy and safety of a potent new selective cholesterol absorption inhibitor, ezetimibe, in patients with primary hypercholesterolemia », *in* : *The American journal of cardiology* 90.10 (2002), p. 1092–1097.
- [261] RH KNOPP et al., « Effects of ezetimibe, a new cholesterol absorption inhibitor, on plasma lipids in patients with primary hypercholesterolemia », *in* : *European heart journal* 24.8 (2003), p. 729–741.
- [262] Mark A VALASEK, Stephen L CLARKE et Joyce J REPA, « Fenofibrate reduces intestinal cholesterol absorption via PPAR α -dependent modulation of NPC1L1 expression in mouse », *in* : *Journal of lipid research* 48.12 (2007), p. 2725–2735.

-
- [263] Carlos LJ VRINS et al., « Peroxisome proliferator-activated receptor delta activation leads to increased transintestinal cholesterol efflux », *in : Journal of lipid research* 50.10 (2009), p. 2046–2054.
- [264] Takuya KIKUCHI et al., « Intestinal CREBH overexpression prevents high-cholesterol diet-induced hypercholesterolemia by reducing Npc1l1 expression », *in : Molecular metabolism* 5.11 (2016), p. 1092–1102.
- [265] F Jeffrey FIELD, Kim WATT et Satya N MATHUR, « Ezetimibe interferes with cholesterol trafficking from the plasma membrane to the endoplasmic reticulum in CaCo-2 cells », *in : Journal of lipid research* 48.8 (2007), p. 1735–1745.
- [266] André J TREMBLAY et al., « Atorvastatin increases intestinal expression of NPC1L1 in hyperlipidemic men », *in : Journal of lipid research* 52.3 (2011), p. 558–565.
- [267] Gregory A GRAF et al., « Coexpression of ATP-binding cassette proteins ABCG5 and ABCG8 permits their transport to the apical surface », *in : The Journal of clinical investigation* 110.5 (2002), p. 659.
- [268] Joyce J REPA et al., « Regulation of ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8 by the liver X receptors α and β », *in : Journal of Biological Chemistry* 277.21 (2002), p. 18793–18800.
- [269] Eric L KLETT et al., « Localization of ABCG5 and ABCG8 proteins in human liver, gall bladder and intestine », *in : BMC gastroenterology* 4.1 (2004), p. 21.
- [270] Liqing YU et al., « Disruption of Abcg5 and Abcg8 in mice reveals their crucial role in biliary cholesterol secretion », *in : Proceedings of the National Academy of Sciences* 99.25 (2002), p. 16237–16242.
- [271] Lita A FREEMAN et al., « The orphan nuclear receptor LRH-1 activates the ABCG5/ABCG8 intergenic promoter », *in : Journal of lipid research* 45.7 (2004), p. 1197–1206.
- [272] Eun-Gyong YOO, « Sitosterolemia : a review and update of pathophysiology, clinical spectrum, diagnosis, and management », *in : Annals of pediatric endocrinology & metabolism* 21.1 (2016), p. 7–14.
- [273] Florence BIETRIX et al., « Accelerated lipid absorption in mice overexpressing intestinal SR-BI », *in : Journal of biological chemistry* 281.11 (2006), p. 7214–7219.

-
- [274] Ariëtte van BENNEKUM et al., « Class B scavenger receptor-mediated intestinal absorption of dietary β -carotene and cholesterol », *in* : *Biochemistry* 44.11 (2005), p. 4517–4525.
- [275] Scott W ALTMANN et al., « The identification of intestinal scavenger receptor class B, type I (SR-BI) by expression cloning and its role in cholesterol absorption », *in* : *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* 1580.1 (2002), p. 77–93.
- [276] Pablo MARDONES et al., « Hepatic cholesterol and bile acid metabolism and intestinal cholesterol absorption in scavenger receptor class B type I-deficient mice », *in* : *Journal of Lipid Research* 42.2 (2001), p. 170–180.
- [277] David Q-H WANG et Martin C CAREY, « Susceptibility to murine cholesterol gallstone formation is not affected by partial disruption of the HDL receptor SR-BI », *in* : *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* 1583.2 (2002), p. 141–150.
- [278] Charles M MANSBACH et Sampath PARTHASARATHY, « A re-examination of the fate of glyceride-glycerol in neutral lipid absorption and transport. », *in* : *Journal of lipid research* 23.7 (1982), p. 1009–1019.
- [279] Judith STORCH, Yin Xiu ZHOU et William S LAGAKOS, « Metabolism of apical versus basolateral sn-2-monoacylglycerol and fatty acids in rodent small intestine », *in* : *Journal of lipid research* 49.8 (2008), p. 1762–1769.
- [280] ALFRED GANGL et ROBERT K OCKNER, « Intestinal metabolism of plasma free fatty acids. Intracellular compartmentation and mechanisms of control. », *in* : *Journal of Clinical Investigation* 55.4 (1975), p. 803.
- [281] Peter STRÅLFORS, « Autolysis of isolated adipocytes by endogenously produced fatty acids », *in* : *FEBS letters* 263.1 (1990), p. 153–154.
- [282] Melissa KAZANTZIS et Andreas STAHL, « Fatty acid transport proteins, implications in physiology and disease », *in* : *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* 1821.5 (2012), p. 852–857.
- [283] Laura L LISTENBERGER, Daniel S ORY et Jean E SCHAFFER, « Palmitate-induced apoptosis can occur through a ceramide-independent pathway », *in* : *Journal of Biological Chemistry* 276.18 (2001), p. 14890–14895.

-
- [284] Andrey FROLOV et al., « Isoforms of rat liver fatty acid binding protein differ in structure and affinity for fatty acids and fatty acyl CoAs », *in* : *Biochemistry* 36.21 (1997), p. 6545–6555.
- [285] Kuo-Tung HSU et Judith STORCH, « Fatty acid transfer from liver and intestinal fatty acid-binding proteins to membranes occurs by different mechanisms », *in* : *Journal of Biological Chemistry* 271.23 (1996), p. 13317–13323.
- [286] Tam M NGUYEN et al., « Cholesterol esterification by ACAT2 is essential for efficient intestinal cholesterol absorption : evidence from thoracic lymph duct cannulation », *in* : *Journal of lipid research* 53.1 (2012), p. 95–104.
- [287] Sylvaine CASES et al., « ACAT-2, a second mammalian acyl-CoA : cholesterol acyltransferase its cloning, expression, and characterization », *in* : *Journal of Biological Chemistry* 273.41 (1998), p. 26755–26764.
- [288] Richard A ANDERSON et al., « Identification of a form of acyl-CoA : cholesterol acyltransferase specific to liver and intestine in nonhuman primates », *in* : *Journal of Biological Chemistry* 273.41 (1998), p. 26747–26754.
- [289] Chi-Liang Eric YEN et Robert V FARESE, « MGAT2, a monoacylglycerol acyltransferase expressed in the small intestine », *in* : *Journal of Biological Chemistry* 278.20 (2003), p. 18532–18537.
- [290] Dong CHENG et al., « Identification of acyl coenzyme A : monoacylglycerol acyltransferase 3, an intestinal specific enzyme implicated in dietary fat absorption », *in* : *Journal of Biological Chemistry* 278.16 (2003), p. 13611–13614.
- [291] Gershon W HEPNER et Laurence M DEMERS, « Dynamics of the enterohepatic circulation of the glycine conjugates of cholic, chenodeoxycholic, deoxycholic, and sulfolithocholic acid in man », *in* : *Gastroenterology* 72.3 (1977), p. 499–501.
- [292] Takahiro SUGA et al., « Preference of conjugated bile acids over unconjugated bile acids as substrates for OATP1B1 and OATP1B3 », *in* : *PloS one* 12.1 (2017), e0169719.
- [293] Alan F HOFMANN, « The syndrome of ileal disease and the broken enterohepatic circulation : choleraic enteropathy », *in* : *Gastroenterology* 52.4 (1967), p. 752–757.

-
- [294] H GLAESER et al., « Intestinal drug transporter expression and the impact of grapefruit juice in humans », *in* : *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 81.3 (2007), p. 362–370.
- [295] Evita van de STEEG et al., « Organic anion transporting polypeptide 1a/1b-knockout mice provide insights into hepatic handling of bilirubin, bile acids, and drugs », *in* : *The Journal of clinical investigation* 120.8 (2010), p. 2942.
- [296] Paul A DAWSON et al., « Targeted deletion of the ileal bile acid transporter eliminates enterohepatic cycling of bile acids in mice », *in* : *Journal of Biological Chemistry* (2003).
- [297] Peter OELKERS et al., « Primary bile acid malabsorption caused by mutations in the ileal sodium-dependent bile acid transporter gene (SLC10A2). », *in* : *Journal of Clinical Investigation* 99.8 (1997), p. 1880.
- [298] James E HEUBI et al., « Primary bile acid malabsorption : defective in vitro ileal active bile acid transport », *in* : *Gastroenterology* 83.4 (1982), p. 804–811.
- [299] AZ EL-SEADY et al., « Lack of evidence for vesicle trafficking of fluorescent bile salts in rat hepatocyte couplets », *in* : *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 272.2 (1997), G298–G309.
- [300] Yong-Zhong GONG et al., « Molecular cloning, tissue distribution, and expression of a 14-kDa bile acid-binding protein from rat ileal cytosol », *in* : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91.11 (1994), p. 4741–4745.
- [301] AW ZIMMERMAN et JH VEERKAMP, « New insights into the structure and function of fatty acid-binding proteins », *in* : *Cellular and Molecular Life Sciences* 59.7 (2002), p. 1096–1116.
- [302] Dana PRASLICKOVA et al., « The ileal lipid binding protein is required for efficient absorption and transport of bile acids in the distal portion of the murine small intestine », *in* : *PloS one* 7.12 (2012), e50810.
- [303] Anuradha RAO et al., « The organic solute transporter α - β , Ost α -Ost β , is essential for intestinal bile acid transport and homeostasis », *in* : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105.10 (2008), p. 3891–3896.

-
- [304] Nazzareno BALLATORI et al., « Ost α -Ost β is required for bile acid and conjugated steroid disposition in the intestine, kidney, and liver », *in* : *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 295.1 (2008), G179–G186.
- [305] Albert MENNONE et al., « Role of breast cancer resistance protein in the adaptive response to cholestasis », *in* : *Drug Metabolism and Disposition* 38.10 (2010), p. 1673–1678.
- [306] Frédéric M VAZ et al., « Sodium taurocholate cotransporting polypeptide (SLC10A1) deficiency : conjugated hypercholanemia without a clear clinical phenotype », *in* : *Hepatology* 61.1 (2015), p. 260–267.
- [307] Martin G BELINSKY et al., « Analysis of the in vivo functions of Mrp3 », *in* : *Molecular pharmacology* 68.1 (2005), p. 160–168.
- [308] Noam ZELCER et al., « Mice lacking Mrp3 (Abcc3) have normal bile salt transport, but altered hepatic transport of endogenous glucuronides », *in* : *Journal of hepatology* 44.4 (2006), p. 768–775.
- [309] Maite G FERNÁNDEZ-BARRENA et al., « Lack of Abcc3 expression impairs bile-acid induced liver growth and delays hepatic regeneration after partial hepatectomy in mice », *in* : *Journal of hepatology* 56.2 (2012), p. 367–373.
- [310] Philippe GÉRARD, « Metabolism of cholesterol and bile acids by the gut microbiota », *in* : *Pathogens* 3.1 (2013), p. 14–24.
- [311] Olivier DUSSURGET et al., « *Listeria monocytogenes* bile salt hydrolase is a PrfA-regulated virulence factor involved in the intestinal and hepatic phases of listeriosis », *in* : *Molecular microbiology* 45.4 (2002), p. 1095–1106.
- [312] Michaela MUELLER et al., « Ursodeoxycholic acid exerts farnesoid X receptor-antagonistic effects on bile acid and lipid metabolism in morbid obesity », *in* : *Journal of hepatology* 62.6 (2015), p. 1398–1404.
- [313] Yazen ALNOUTI, « Bile acid sulfation : a pathway of bile acid elimination and detoxification », *in* : *Toxicological Sciences* 108.2 (2009), p. 225–246.
- [314] Thomas F KELLOGG, « Steroid balance and tissue cholesterol accumulation in germfree and conventional rats fed diets containing saturated and polyunsaturated fats », *in* : *Journal of lipid research* 15.6 (1974), p. 574–579.

-
- [315] Tatu A MIETTINEN, Alan PROIA et Donald J MCNAMARA, « Origins of fecal neutral steroids in rats. », *in* : *Journal of lipid research* 22.3 (1981), p. 485–495.
- [316] Patrick VEIGA et al., « Correlation between faecal microbial community structure and cholesterol-to-coprostanol conversion in the human gut », *in* : *FEMS microbiology letters* 242.1 (2005), p. 81–86.
- [317] Tracy D WILKINS et Abigail S HACKMAN, « Two patterns of neutral steroid conversion in the feces of normal North Americans », *in* : *Cancer research* 34.9 (1974), p. 2250–2254.
- [318] IA MACDONALD et al., « Degradation of steroids in the human gut. », *in* : *Journal of Lipid Research* 24.6 (1983), p. 675–700.
- [319] Alice H LICHTENSTEIN, « Intestinal cholesterol metabolism », *in* : *Annals of medicine* 22.1 (1990), p. 49–52.
- [320] Huey-Shi LYE, Gulam Rusul RAHMAT-ALI et Min-Tze LIONG, « Mechanisms of cholesterol removal by lactobacilli under conditions that mimic the human gastrointestinal tract », *in* : *International Dairy Journal* 20.3 (2010), p. 169–175.
- [321] Philippe GÉRARD et al., « Bacteroides sp. strain D8, the first cholesterol-reducing bacterium isolated from human feces », *in* : *Applied and environmental microbiology* 73.18 (2007), p. 5742–5749.
- [322] Ian J CARTWRIGHT et Joan A HIGGINS, « Direct evidence for a two-step assembly of ApoB48-containing lipoproteins in the lumen of the smooth endoplasmic reticulum of rabbit enterocytes », *in* : *Journal of Biological Chemistry* 276.51 (2001), p. 48048–48057.
- [323] Edward A FISHER et Henry N GINSBERG, « Complexity in the secretory pathway : the assembly and secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins », *in* : *Journal of Biological Chemistry* 277.20 (2002), p. 17377–17380.
- [324] Rajalakshmi PARIYARATH et al., « Co-translational interactions of apoprotein B with the ribosome and translocon during lipoprotein assembly or targeting to the proteasome », *in* : *Journal of Biological Chemistry* 276.1 (2001), p. 541–550.

-
- [325] Masumi AI, Akira TANAKA et Ernst SCHAEFER, « Apolipoprotein B-48 : A unique marker of chylomicron metabolism », *in* : *Advances in clinical chemistry* 64 (2014), p. 117.
- [326] San-Hwan CHEN et al., « RNA editing of apolipoprotein B mRNA. Sequence specificity determined by in vitro coupled transcription editing. », *in* : *Journal of Biological Chemistry* 265.12 (1990), p. 6811–6816.
- [327] Chun-Min LO et al., « Why does the gut choose apolipoprotein B48 but not B100 for chylomicron formation ? », *in* : *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 294.1 (2008), G344–G352.
- [328] Jeffgr M HOEG et al., « Both apolipoproteins B-48 and B-100 are synthesized and secreted by the human intestine. », *in* : *Journal of lipid research* 31.10 (1990), p. 1761–1769.
- [329] Z Gordon JIANG et al., « Reconstituting initial events during the assembly of apolipoprotein B-containing lipoproteins in a cell-free system », *in* : *Journal of molecular biology* 383.5 (2008), p. 1181–1194.
- [330] Xujun WU et al., « Demonstration of a physical interaction between microsomal triglyceride transfer protein and apolipoprotein B during the assembly of ApoB-containing lipoproteins », *in* : *Journal of Biological Chemistry* 271.17 (1996), p. 10277–10281.
- [331] Paul RAVA et M Mahmood HUSSAIN, « Acquisition of triacylglycerol transfer activity by microsomal triglyceride transfer protein during evolution », *in* : *Biochemistry* 46.43 (2007), p. 12263–12274.
- [332] Song LU et al., « Overexpression of apolipoprotein A-IV enhances lipid secretion in IPEC-1 cells by increasing chylomicron size », *in* : *Journal of Biological Chemistry* 281.6 (2006), p. 3473–3483.
- [333] R GONZALEZ-VALLINA et al., « Lipoprotein and apolipoprotein secretion by a newborn piglet intestinal cell line (IPEC-1) », *in* : *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 271.2 (1996), G249–G259.
- [334] Richard B WEINBERG et al., « ApoA-IV modulates the secretory trafficking of apoB and the size of triglyceride-rich lipoproteins », *in* : *Journal of lipid research* 53.4 (2012), p. 736–743.

-
- [335] Ying YAO et al., « Regulation of microsomal triglyceride transfer protein by apolipoprotein A-IV in newborn swine intestinal epithelial cells », *in* : *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 300.2 (2011), G357–G363.
- [336] ML PHILLIPS et al., « A single copy of apolipoprotein B-48 is present on the human chylomicron remnant. », *in* : *Journal of lipid research* 38.6 (1997), p. 1170–1177.
- [337] Scott M STAGG et al., « Structural basis for cargo regulation of COPII coat assembly », *in* : *Cell* 134.3 (2008), p. 474–484.
- [338] Shadab A SIDDIQI et al., « COPII proteins are required for Golgi fusion but not for endoplasmic reticulum budding of the pre-chylomicron transport vesicle », *in* : *Journal of cell science* 116.2 (2003), p. 415–427.
- [339] Shadab A SIDDIQI et al., « The identification of a novel endoplasmic reticulum to Golgi SNARE complex used by the prechylomicron transport vesicle », *in* : *Journal of Biological Chemistry* 281.30 (2006), p. 20974–20982.
- [340] Shahzad SIDDIQI, Shadab A SIDDIQI et Charles M MANSBACH, « Sec24C is required for docking the prechylomicron transport vesicle with the Golgi », *in* : *Journal of lipid research* 51.5 (2010), p. 1093–1100.
- [341] Nathalie BERRIOT-VAROQUEAUX et al., « Apolipoprotein B48 glycosylation in abetalipoproteinemia and Anderson’s disease », *in* : *Gastroenterology* 121.5 (2001), p. 1101–1108.
- [342] Emile LEVY et al., « Localization of Microsomal Triglyceride Transfer Protein in the Golgi POSSIBLE ROLE IN THE ASSEMBLY OF CHYLOMICRONS », *in* : *Journal of Biological Chemistry* 277.19 (2002), p. 16470–16477.
- [343] Seymour M SABESIN et Sharon FRASE, « Electron microscopic studies of the assembly, intracellular transport, and secretion of chylomicrons by rat intestine. », *in* : *Journal of lipid research* 18.4 (1977), p. 496–511.
- [344] Changting XIAO et al., « Gut-liver interaction in triglyceride-rich lipoprotein metabolism », *in* : *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 301.3 (2011), E429–E446.

-
- [345] Jeffrey S COHN, Caroline MARCOUX et Jean DAVIGNON, « Detection, quantification, and characterization of potentially atherogenic triglyceride-rich remnant lipoproteins », *in* : *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 19.10 (1999), p. 2474–2486.
- [346] Roger SAVONEN et al., « The tissue distribution of lipoprotein lipase determines where chylomicrons bind », *in* : *Journal of lipid research* 56.3 (2015), p. 588–598.
- [347] Satya DASH et al., « New insights into the regulation of chylomicron production », *in* : *Annual review of nutrition* 35 (2015), p. 265–294.
- [348] Robert A HEGELE, « Plasma lipoproteins : genetic influences and clinical implications », *in* : *Nature reviews. Genetics* 10.2 (2009), p. 109.
- [349] TG THE, HDL Working Group of the EXOME et Sequencing PROJECT, « Loss-of-function mutations in APOC3, triglycerides, and coronary disease », *in* : *The New England journal of medicine* 371.1 (2014), p. 22.
- [350] Anders Berg JØRGENSEN et al., « Loss-of-function mutations in APOC3 and risk of ischemic vascular disease », *in* : *New England Journal of Medicine* 371.1 (2014), p. 32–41.
- [351] Anne P BEIGNEUX et al., « Glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein-binding protein 1 plays a critical role in the lipolytic processing of chylomicrons », *in* : *Cell metabolism* 5.4 (2007), p. 279–291.
- [352] Christopher T JOHANSEN et Robert A HEGELE, « Allelic and phenotypic spectrum of plasma triglycerides », *in* : *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* 1821.5 (2012), p. 833–842.
- [353] KM BOTHAM et al., *The induction of macrophage foam cell formation by chylomicron remnants*, 2007.
- [354] M Mahmood HUSSAIN et al., « Clearance of chylomicron remnants by the low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor. », *in* : *Journal of Biological Chemistry* 266.21 (1991), p. 13936–13940.
- [355] TE WILLNOW, « Mechanisms of hepatic chylomicron remnant clearance », *in* : *Diabetic medicine* 14.S3 (1997).

-
- [356] Rosa N CHAVEZ–JAUREGUI, Richard D MATTES et Elizabeth J PARKS, « Dynamics of fat absorption and effect of sham feeding on postprandial lipemia », *in* : *Gastroenterology* 139.5 (2010), p. 1538–1548.
- [357] Satya DASH et al., « Glucagon-like peptide-2 regulates release of chylomicrons from the intestine », *in* : *Gastroenterology* 147.6 (2014), p. 1275–1284.
- [358] Barbara A FIELDING et al., « Postprandial lipemia : the origin of an early peak studied by specific dietary fatty acid intake during sequential meals. », *in* : *The American journal of clinical nutrition* 63.1 (1996), p. 36–41.
- [359] Kevin EVANS et al., « Rapid chylomicron appearance following sequential meals : effects of second meal composition », *in* : *British Journal of Nutrition* 79.5 (1998), p. 425–429.
- [360] MD ROBERTSON et al., « Mobilisation of enterocyte fat stores by oral glucose in humans », *in* : *Gut* 52.6 (2003), p. 834–839.
- [361] Tavia GORDON et al., « High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease : the Framingham Study », *in* : *The American journal of medicine* 62.5 (1977), p. 707–714.
- [362] Kerry-Anne RYE, *High density lipoprotein structure, function, and metabolism : a new Thematic Series*, 2013.
- [363] Gary F LEWIS et Daniel J RADER, « New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport », *in* : *Circulation research* 96.12 (2005), p. 1221–1232.
- [364] JA KUIVENHOVEN et al., « The molecular pathology of lecithin : cholesterol acyltransferase (LCAT) deficiency syndromes. », *in* : *Journal of lipid research* 38.2 (1997), p. 191–205.
- [365] Dominic S NG, « Treating low HDL—From bench to bedside », *in* : *Clinical biochemistry* 37.8 (2004), p. 649–659.
- [366] Liam R BRUNHAM et al., « Intestinal ABCA1 directly contributes to HDL biogenesis in vivo », *in* : *Journal of Clinical Investigation* 116.4 (2006), p. 1052.

-
- [367] Ai-Lien WU et Herbert G WINDMUELLER, « Relative contributions by liver and intestine to individual plasma apolipoproteins in the rat. », *in* : *Journal of Biological Chemistry* 254.15 (1979), p. 7316–7322.
- [368] Shlomo EISENBERG, « High density lipoprotein metabolism. », *in* : *Journal of lipid research* 25.10 (1984), p. 1017–1058.
- [369] Vassilis I ZANNIS, Angeliki CHRONI et Monty KRIEGER, « Role of apoA-I, ABCA1, LCAT, and SR-BI in the biogenesis of HDL », *in* : *Journal of molecular medicine* 84.4 (2006), p. 276–294.
- [370] Ken-ichi HIRANO et al., « Atherosclerotic disease in marked hyperalphalipoproteinemia », *in* : *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 15.11 (1995), p. 1849–1856.
- [371] Ken-ichi HIRANO et al., « Genetic cholesteryl ester transfer protein deficiency is extremely frequent in the Omagari area of Japan », *in* : *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 17.6 (1997), p. 1053–1059.
- [372] Steven E NISSEN et al., « Effect of torcetrapib on the progression of coronary atherosclerosis », *in* : *New England Journal of Medicine* 356.13 (2007), p. 1304–1316.
- [373] Philip J BARTER et Kerry-Anne RYE, « Cholesteryl ester transfer protein inhibition as a strategy to reduce cardiovascular risk », *in* : *Journal of lipid research* 53.9 (2012), p. 1755–1766.
- [374] Gregory G SCHWARTZ et al., « Effects of dalcetrapib in patients with a recent acute coronary syndrome », *in* : *New England Journal of Medicine* 367.22 (2012), p. 2089–2099.
- [375] Warren M SPERRY, « Lipid excretion IV. A study of the relationship of the bile to the fecal lipids with special reference to certain problems of sterol metabolism », *in* : *Journal of Biological Chemistry* 71.2 (1927), p. 351–378.
- [376] Demetrius PERTSEMLIDIS, Ernest H KIRCHMAN et EH AHRENS JR, « Regulation of Cholesterol Metabolism in the Dog : I. EFFECTS OF COMPLETE BILE DIVERSION AND OF CHOLESTEROL FEEDING ON ABSORPTION, SYNTHESIS, ACCUMULATION, AND EXCRETION RATES MEASURED DURING LIFE », *in* : *Journal of Clinical Investigation* 52.9 (1973), p. 2353.

-
- [377] Janine K KRUIT et al., « Increased fecal neutral sterol loss upon liver X receptor activation is independent of biliary sterol secretion in mice », *in* : *Gastroenterology* 128.1 (2005), p. 147–156.
- [378] Astrid E VAN DER VELDE et al., « Direct intestinal cholesterol secretion contributes significantly to total fecal neutral sterol excretion in mice », *in* : *Gastroenterology* 133.3 (2007), p. 967–975.
- [379] Jelske N van der VEEN et al., « Activation of the liver X receptor stimulates transintestinal excretion of plasma cholesterol », *in* : *Journal of Biological Chemistry* 284.29 (2009), p. 19211–19219.
- [380] Cédric LE MAY et al., « Transintestinal cholesterol excretion is an active metabolic process modulated by PCSK9 and statin involving ABCB1 », *in* : *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 33.7 (2013), p. 1484–1493.
- [381] Torsten PLÖSCH et al., « Increased hepatobiliary and fecal cholesterol excretion upon activation of the liver X receptor is independent of ABCA1 », *in* : *Journal of Biological Chemistry* 277.37 (2002), p. 33870–33877.
- [382] Carlos LJ VRINS et al., « Trans-intestinal cholesterol efflux is not mediated through high density lipoprotein », *in* : *Journal of lipid research* 53.10 (2012), p. 2017–2023.
- [383] Jan Freark de BOER et al., « Intestinal farnesoid X receptor controls transintestinal cholesterol excretion in mice », *in* : *Gastroenterology* 152.5 (2017), p. 1126–1138.
- [384] Stephanie M MARSHALL et al., « Reduction of VLDL secretion decreases cholesterol excretion in niemann-pick C1-like 1 hepatic transgenic mice », *in* : *PloS one* 9.1 (2014), e84418.
- [385] Astrid E van der VELDE et al., « Regulation of direct transintestinal cholesterol excretion in mice », *in* : *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 295.1 (2008), G203–G208.
- [386] Gemma BRUFAU et al., « A reappraisal of the mechanism by which plant sterols promote neutral sterol loss in mice », *in* : *PLoS One* 6.6 (2011), e21576.
- [387] Milka SOKOLOVIĆ et al., « Unexpected effects of fasting on murine lipid homeostasis—transcriptomic and lipid profiling », *in* : *Journal of hepatology* 52.5 (2010), p. 737–744.

-
- [388] Lily JAKULJ et al., « Ezetimibe stimulates faecal neutral sterol excretion depending on abcg8 function in mice », *in* : *FEBS letters* 584.16 (2010), p. 3625–3628.
- [389] Kanwardeep S BURA et al., « Intestinal SR-BI does not impact cholesterol absorption or transintestinal cholesterol efflux in mice », *in* : *Journal of lipid research* 54.6 (2013), p. 1567–1577.
- [390] Jin WANG et al., « Relative roles of ABCG5/ABCG8 in liver and intestine », *in* : *Journal of lipid research* 56.2 (2015), p. 319–330.
- [391] Franz THIEBAUT et al., « Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues », *in* : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84.21 (1987), p. 7735–7738.
- [392] Takaharu MIZUTANI et al., « Genuine functions of P-glycoprotein (ABCB1) », *in* : *Current drug metabolism* 9.2 (2008), p. 167–174.
- [393] Lily JAKULJ et al., « Transintestinal cholesterol transport is active in mice and humans and controls ezetimibe-induced fecal neutral sterol excretion », *in* : *Cell metabolism* 24.6 (2016), p. 783–794.
- [394] Samuel H CHENG et Malcolm M STANLEY, « Secretion of Cholesterol by Intestinal Mucosa in Patients with Complete Common Bile Duct Obstruction. », *in* : *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 101.2 (1959), p. 223–225.
- [395] Malcolm M STANLEY, Esteban P PINEDA et Samuel H CHENG, « Serum cholesterol esters and intestinal cholesterol secretion and absorption in obstructive jaundice due to cancer », *in* : *New England Journal of Medicine* 261.8 (1959), p. 368–373.
- [396] Wilfred J SIMMONDS, Alan F HOFMANN et Emanuel THEODOR, « Absorption of cholesterol from a micellar solution : intestinal perfusion studies in man », *in* : *Journal of Clinical Investigation* 46.5 (1967), p. 874.
- [397] Emile LEVY, « Insights from human congenital disorders of intestinal lipid metabolism », *in* : *Journal of lipid research* 56.5 (2015), p. 945–962.
- [398] John R WETTERAU et al., « Absence of microsomal triglyceride transfer protein in individuals with abetalipoproteinemia », *in* : *SCIENCE-NEW YORK THEN WASHINGTON-* 258 (1992), p. 999–999.

-
- [399] David A GORDON et al., « Secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins from HeLa cells is dependent on expression of the microsomal triglyceride transfer protein and is regulated by lipid availability », *in : Proceedings of the National Academy of Sciences* 91.16 (1994), p. 7628–7632.
- [400] James M LEIPER et al., « Microsomal triglyceride transfer protein, the abetalipoproteinemia gene product, mediates the secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins from heterologous cells. », *in : Journal of Biological Chemistry* 269.35 (1994), p. 21951–21954.
- [401] Teresa ME NARCISI et al., « Mutations of the microsomal triglyceride-transfer-protein gene in abetalipoproteinemia », *in : American journal of human genetics* 57.6 (1995), p. 1298.
- [402] Bard J GEESAMAN et al., « Haplotype-based identification of a microsomal transfer protein marker associated with the human lifespan », *in : Proceedings of the National Academy of Sciences* 100.24 (2003), p. 14115–14120.
- [403] Fredrik KARPE et al., « A common functional polymorphism in the promoter region of the microsomal triglyceride transfer protein gene influences plasma LDL levels », *in : Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 18.5 (1998), p. 756–761.
- [404] Marina CUCHEL et al., « Efficacy and safety of a microsomal triglyceride transfer protein inhibitor in patients with homozygous familial hypercholesterolaemia : a single-arm, open-label, phase 3 study », *in : The Lancet* 381.9860 (2013), p. 40–46.
- [405] Anne C GOLDBERG, « Emerging low-density lipoprotein therapies : microsomal triglyceride transfer protein inhibitors », *in : Journal of clinical lipidology* 7.3 (2013), S16–S20.
- [406] Marie C LIN et al., « Garlic inhibits microsomal triglyceride transfer protein gene expression in human liver and intestinal cell lines and in rat intestine », *in : The Journal of nutrition* 132.6 (2002), p. 1165–1168.
- [407] MC LIN et al., « Ethanol down-regulates the transcription of microsomal triglyceride transfer protein gene. », *in : The FASEB journal* 11.13 (1997), p. 1145–1152.

-
- [408] Lisa J WILCOX et al., « Secretion of hepatocyte apoB is inhibited by the flavonoids, naringenin and hesperetin, via reduced activity and expression of ACAT2 and MTP », *in* : *Journal of lipid research* 42.5 (2001), p. 725–734.
- [409] Gustav SCHONFELD, « Familial hypobetalipoproteinemia a review », *in* : *Journal of lipid research* 44.5 (2003), p. 878–883.
- [410] Hyock Joo KWON, Maya PALNITKAR et Johann DEISENHOFER, « The structure of the NPC1L1 N-terminal domain in a closed conformation », *in* : *PLoS One* 6.4 (2011), e18722.
- [411] Ashim K BHATTACHARYYA et William E CONNOR, « β -Sitosterolemia and xanthomatosis : a newly described lipid storage disease in two sisters », *in* : *Journal of Clinical Investigation* 53.4 (1974), p. 1033.
- [412] Gerald SALEN et al., « Sitosterolemia. », *in* : *Journal of Lipid Research* 33.7 (1992), p. 945–955.
- [413] Jonathan C COHEN et al., « Multiple rare variants in NPC1L1 associated with reduced sterol absorption and plasma low-density lipoprotein levels », *in* : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103.6 (2006), p. 1810–1815.
- [414] Saleemah FAHMI et al., « Functional characterization of genetic variants in NPC1L1 supports the sequencing extremes strategy to identify complex trait genes », *in* : *Human molecular genetics* 17.14 (2008), p. 2101–2107.
- [415] Li-Juan WANG et al., « Molecular characterization of the NPC1L1 variants identified from cholesterol low absorbers », *in* : *Journal of Biological Chemistry* 286.9 (2011), p. 7397–7408.
- [416] Jason S SIMON et al., « Sequence variation in NPC1L1 and association with improved LDL-cholesterol lowering in response to ezetimibe treatment », *in* : *Genomics* 86.6 (2005), p. 648–656.
- [417] A LITONJUA et R SY, « Lipid lowering effect of orlistat beyond weight reduction in overweight/obese Filipino patients : an RCT study », *in* : *Phil J Internal Medicine* 42.3 (2004), p. 297–305.

-
- [418] Raj S PADWAL et Sumit R MAJUMDAR, « Drug treatments for obesity : orlistat, sibutramine, and rimonabant », *in* : *The Lancet* 369.9555 (2007), p. 71–77.
- [419] Frederick S GABRIEL et al., « Postprandial effect of orlistat on the peaking of lipid level after sequential high fat meals », *in* : *International journal of endocrinology and metabolism* 10.2 (2012), p. 458.
- [420] Joanne HSIEH et al., « Glucagon-like peptide-2 increases intestinal lipid absorption and chylomicron production via CD36 », *in* : *Gastroenterology* 137.3 (2009), p. 997–1005.
- [421] Carolyn F DEACON et al., « Glucagon-like peptide 1 undergoes differential tissue-specific metabolism in the anesthetized pig », *in* : *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism* 271.3 (1996), E458–E464.
- [422] N MATIKAINEN et M-R TASKINEN, « The effect of vildagliptin therapy on atherogenic postprandial remnant particles and LDL particle size in subjects with type 2 diabetes », *in* : *Diabetic Medicine* 30.6 (2013), p. 756–757.
- [423] Lalita PRASAD-REDDY et Diana ISAACS, « A clinical review of GLP-1 receptor agonists : efficacy and safety in diabetes and beyond », *in* : *Drugs in context* 4 (2015).
- [424] Dhanwantee MUNDIL, Alison CAMERON-VENDRIG et Mansoor HUSAIN, « GLP-1 receptor agonists : a clinical perspective on cardiovascular effects », *in* : *Diabetes and Vascular Disease Research* 9.2 (2012), p. 95–108.
- [425] Tatu MIETTINEN et Helena GYLLING, « Plant stanol and sterol esters in prevention of cardiovascular diseases », *in* : *Annals of medicine* 36.2 (2004), p. 126–134.
- [426] Bernd GENSER et al., « Plant sterols and cardiovascular disease : a systematic review and meta-analysis », *in* : *European heart journal* 33.4 (2012), p. 444–451.
- [427] Richard E OSTLUND et al., « Phytosterols that are naturally present in commercial corn oil significantly reduce cholesterol absorption in humans », *in* : *The American journal of clinical nutrition* 75.6 (2002), p. 1000–1004.
- [428] AL CATAPANO, « Ezetimibe : a selective inhibitor of cholesterol absorption », *in* : *European Heart Journal Supplements* 3.suppl_E (2001), E6–E10.

-
- [429] Reinhard BRAUNER et al., « Phytosterols reduce cholesterol absorption by inhibition of 27-hydroxycholesterol generation, liver X receptor α activation, and expression of the basolateral sterol exporter ATP-binding cassette A1 in Caco-2 enterocytes », *in* : *The Journal of nutrition* 142.6 (2012), p. 981–989.
- [430] Susan B RACETTE et al., « Dose effects of dietary phytosterols on cholesterol metabolism : a controlled feeding study », *in* : *The American journal of clinical nutrition* 91.1 (2010), p. 32–38.
- [431] Ingmar WESTER, « Cholesterol-lowering effect of plant sterols », *in* : *European Journal of Lipid Science and Technology* 102.1 (2000), p. 37–44.
- [432] Tatu A MIETTINEN, « Cholesterol absorption inhibition : a strategy for cholesterol-lowering therapy. », *in* : *International journal of clinical practice* 55.10 (2001), p. 710–716.
- [433] Oliver WEINGÄRTNER, Michael BÖHM et Ulrich LAUFS, « Controversial role of plant sterol esters in the management of hypercholesterolaemia », *in* : *European heart journal* 30.4 (2009), p. 404–409.
- [434] Enquête OBEPI, « Enquête épidémiologique nationale sur le surpoids et l'obésité », *in* : *Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Laboratoire Roche* (2012).
- [435] Amanda R VEST et al., « Bariatric surgery and cardiovascular outcomes : a systematic review », *in* : *Heart* (2012), heartjnl-2012.
- [436] Audrey AYER et al., « Techniques of Sleeve Gastrectomy and Modified Roux-en-Y Gastric Bypass in Mice », *in* : *JoVE (Journal of Visualized Experiments)* 121 (2017), e54905–e54905.
- [437] Nancy PUZZIFERRI et al., « Long-term follow-up after bariatric surgery : a systematic review », *in* : *Jama* 312.9 (2014), p. 934–942.
- [438] Anita P COURCOULAS et al., « Weight change and health outcomes at 3 years after bariatric surgery among individuals with severe obesity », *in* : *Jama* 310.22 (2013), p. 2416–2425.

-
- [439] Ali AMINIAN et al., « Exploring the impact of bariatric surgery on high density lipoprotein », *in* : *Surgery for Obesity and Related Diseases* 11.1 (2015), p. 238–247.
- [440] Josep JULVE et al., « Bariatric surgery in morbidly obese patients improves the atherogenic qualitative properties of the plasma lipoproteins », *in* : *Atherosclerosis* 234.1 (2014), p. 200–205.
- [441] Margaret A STEFATER et al., « Sleeve gastrectomy in rats improves postprandial lipid clearance by reducing intestinal triglyceride secretion », *in* : *Gastroenterology* 141.3 (2011), p. 939–949.
- [442] E GRIFFO et al., « Early improvement of postprandial lipemia after bariatric surgery in obese type 2 diabetic patients », *in* : *Obesity surgery* 24.5 (2014), p. 765–770.
- [443] Henry BUCHWALD et al., « Weight and type 2 diabetes after bariatric surgery : systematic review and meta-analysis », *in* : *The American journal of medicine* 122.3 (2009), p. 248–256.
- [444] Cristian RICCI et al., « Early impact of bariatric surgery on type II diabetes, hypertension, and hyperlipidemia : a systematic review, meta-analysis and meta-regression on 6,587 patients », *in* : *Obesity surgery* 24.4 (2014), p. 522–528.
- [445] L SJÖSTRÖM, « Review of the key results from the Swedish Obese Subjects (SOS) trial—a prospective controlled intervention study of bariatric surgery », *in* : *Journal of internal medicine* 273.3 (2013), p. 219–234.
- [446] Fredrik BÄCKHED et al., « The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage », *in* : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101.44 (2004), p. 15718–15723.
- [447] Fredrik BÄCKHED et al., « Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice », *in* : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104.3 (2007), p. 979–984.
- [448] Alice P LIOU et al., « Conserved shifts in the gut microbiota due to gastric bypass reduce host weight and adiposity », *in* : *Science translational medicine* 5.178 (2013), 178ra41–178ra41.

-
- [449] Jean-Pierre FURET et al., « Differential adaptation of human gut microbiota to bariatric surgery-induced weight loss », *in* : *Diabetes* 59.12 (2010), p. 3049–3057.
- [450] Jia V LI et al., « Metabolic surgery profoundly influences gut microbial–host metabolic cross-talk », *in* : *Gut* 60.9 (2011), p. 1214–1223.
- [451] Rohit KOHLI et al., « A surgical model in male obese rats uncovers protective effects of bile acids post-bariatric surgery », *in* : *Endocrinology* 154.7 (2013), p. 2341–2351.
- [452] Robert E STEINERT et al., « Bile acids and gut peptide secretion after bariatric surgery : a 1-year prospective randomized pilot trial », *in* : *Obesity* 21.12 (2013).
- [453] Bethany P CUMMINGS et al., « Vertical sleeve gastrectomy improves glucose and lipid metabolism and delays diabetes onset in UCD-T2DM rats », *in* : *Endocrinology* 153.8 (2012), p. 3620–3632.
- [454] Oscar CHÁVEZ-TALAVERA et al., « Bile acid control of metabolism and inflammation in obesity, type 2 diabetes, dyslipidemia, and nonalcoholic fatty liver disease », *in* : *Gastroenterology* 152.7 (2017), p. 1679–1694.
- [455] Cyrus JAHANSOUZ et al., « One-Week Comparison of Circulating Bile Acids in Patients after Roux-En-Y Gastric Bypass vs Restricted Hypocaloric Diet », *in* : *Journal of the American College of Surgeons* 221.4 (2015), S15.
- [456] Charles Robb FLYNN et al., « Bile diversion to the distal small intestine has comparable metabolic benefits to bariatric surgery », *in* : *Nature communications* 6 (2015).
- [457] Karen K RYAN et al., « FXR is a molecular target for the effects of vertical sleeve gastrectomy », *in* : *Nature* 509.7499 (2014), p. 183.
- [458] Carel W le ROUX et al., « Gut hormone profiles following bariatric surgery favor an anorectic state, facilitate weight loss, and improve metabolic parameters », *in* : *Annals of surgery* 243.1 (2006), p. 108.
- [459] Stavros N KARAMANAKOS et al., « Weight loss, appetite suppression, and changes in fasting and postprandial ghrelin and peptide-YY levels after Roux-en-Y gastric bypass and sleeve gastrectomy : a prospective, double blind study », *in* : *Annals of surgery* 247.3 (2008), p. 401–407.

-
- [460] C DIRKSEN et al., « Gut hormones, early dumping and resting energy expenditure in patients with good and poor weight loss response after Roux-en-Y gastric bypass », *in* : *International journal of obesity* 37.11 (2013), p. 1452.
- [461] Shashank SHAH et al., « Prospective controlled study of effect of laparoscopic sleeve gastrectomy on small bowel transit time and gastric emptying half-time in morbidly obese patients with type 2 diabetes mellitus », *in* : *Surgery for Obesity and Related Diseases* 6.2 (2010), p. 152–157.
- [462] HE PARKER et al., « Molecular mechanisms underlying bile acid-stimulated glucagon-like peptide-1 secretion », *in* : *British journal of pharmacology* 165.2 (2012), p. 414–423.
- [463] David RUSSELL-JONES et Stephen GOUGH, « Recent advances in incretin-based therapies », *in* : *Clinical endocrinology* 77.4 (2012), p. 489–499.
- [464] Hilary E WILSON-PÉREZ et al., « Vertical sleeve gastrectomy is effective in two genetic mouse models of glucagon-like Peptide 1 receptor deficiency », *in* : *Diabetes* 62.7 (2013), p. 2380–2385.
- [465] Sean P HEFFRON et al., « Changes in Lipid profile of obese patients following contemporary bariatric surgery : a meta-analysis », *in* : *The American journal of medicine* 129.9 (2016), p. 952–959.
- [466] Ignacio GARCIA-MARIRRODRIGA et al., « Evolution of lipid profiles after bariatric surgery », *in* : *Obesity surgery* 22.4 (2012), p. 609–616.
- [467] Olivier F NOEL et al., « Bile acids, FXR, and metabolic effects of bariatric surgery », *in* : *Journal of obesity* 2016 (2016).
- [468] Deanna M ARBLE, Darleen A SANDOVAL et Randy J SEELEY, « Mechanisms underlying weight loss and metabolic improvements in rodent models of bariatric surgery », *in* : *Diabetologia* 58.2 (2015), p. 211–220.
- [469] Ahmed ZAID et al., « Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) : hepatocyte-specific low-density lipoprotein receptor degradation and critical role in mouse liver regeneration », *in* : *Hepatology* 48.2 (2008), p. 646–654.

-
- [470] Cédric LE MAY et al., « Proprotein convertase subtilisin kexin type 9 null mice are protected from postprandial triglyceridemia », *in : Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 29.5 (2009), p. 684–690.
- [471] Emile LEVY et al., « PCSK9 plays a significant role in cholesterol homeostasis and lipid transport in intestinal epithelial cells », *in : Atherosclerosis* 227.2 (2013), p. 297–306.
- [472] Patrice D CANI et al., « Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice », *in : Diabetes* 57.6 (2008), p. 1470–1481.
- [473] Claire Barbier de LA SERRE et al., « Propensity to high-fat diet-induced obesity in rats is associated with changes in the gut microbiota and gut inflammation », *in : American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 299.2 (2010), G440–G448.
- [474] Werner KRAMER et al., « Intestinal cholesterol absorption : identification of different binding proteins for cholesterol and cholesterol absorption inhibitors in the enterocyte brush border membrane », *in : Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* 1633.1 (2003), p. 13–26.
- [475] David Y HUI, Eric D LABONTÉ et Philip N HOWLES, « Development and physiological regulation of intestinal lipid absorption. III. Intestinal transporters and cholesterol absorption », *in : American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 294.4 (2008), G839–G843.
- [476] Henry BUCHWALD et al., « Bariatric surgery : a systematic review and meta-analysis », *in : Jama* 292.14 (2004), p. 1724–1737.
- [477] Jussi PIHLAJAMÄKI et al., « Cholesterol absorption decreases after Roux-en-Y gastric bypass but not after gastric banding », *in : Metabolism* 59.6 (2010), p. 866–872.
- [478] Claire BLANCHARD et al., « Sleeve Gastrectomy Alters Intestinal Permeability in Diet-Induced Obese Mice », *in : Obesity Surgery* (2017), p. 1–9.
- [479] Carl Frederik HANSEN et al., « Hypertrophy dependent doubling of L-cells in Roux-en-Y gastric bypass operated rats », *in : PloS one* 8.6 (2013), e65696.

-
- [480] Zhenze ZHAO et al., « Molecular characterization of loss-of-function mutations in PCSK9 and identification of a compound heterozygote », *in* : *The American Journal of Human Genetics* 79.3 (2006), p. 514–523.
- [481] Verena TRETTER, Friedrich ALTMANN et Leopold MÄRZ, « Peptide-N4-(N-acetyl- β -glucosaminy) asparagine amidase F cannot release glycans with fucose attached $\alpha 1 \rightarrow 3$ to the asparagine-linked N-acetylglucosamine residue », *in* : *The FEBS Journal* 199.3 (1991), p. 647–652.
- [482] Bing MA, Joanne L SIMALA-GRANT et Diane E TAYLOR, « Fucosylation in prokaryotes and eukaryotes », *in* : *Glycobiology* 16.12 (2006), 158R–184R.
- [483] Akira KOBATA, « Structures and functions of the sugar chains of glycoproteins », *in* : *The FEBS Journal* 209.2 (1992), p. 483–501.
- [484] Samuel BOUYAIN et al., « An endogenous Drosophila receptor for glycans bearing $\alpha 1, 3$ -linked core fucose residues », *in* : *Journal of Biological Chemistry* 277.25 (2002), p. 22566–22572.
- [485] Peter BOTH et al., « Distantly related plant and nematode core $\alpha 1, 3$ -fucosyltransferases display similar trends in structure–function relationships », *in* : *Glycobiology* 21.11 (2011), p. 1401–1415.
- [486] Geetha SRIKRISHNA et al., « A novel anionic modification of N-glycans on mammalian endothelial cells is recognized by activated neutrophils and modulates acute inflammatory responses », *in* : *The Journal of Immunology* 166.1 (2001), p. 624–632.
- [487] Ana Izabel Silva Balbin VILLAVERDE, Louise HETHERINGTON et Mark A BAKER, « Quantitative Glycopeptide Changes in Rat Sperm During Epididymal Transit », *in* : *Biology of reproduction* 94.4 (2016).

Thèse de Doctorat

François MOREAU

Rôle de PCSK9 et conséquences des chirurgies bariatriques sur le métabolisme intestinal du cholestérol

Résumé

L'intestin est un acteur majeur du métabolisme du cholestérol de part son rôle dans l'absorption, la sécrétion des lipoprotéines et l'efflux transintestinal de cholestérol (TICE). De plus, c'est le second organe majeur, après le foie, à exprimer la Protéine Convertase Subtilisine Kexine de type 9 (PCSK9), un inhibiteur naturel du récepteur aux LDL.

Notre analyse des mécanismes moléculaires impliqués dans l'hypocholestérolémie induite par les chirurgies bariatriques montre que la sleeve gastrectomie induit une hypocholestérolémie transitoire et modérée liée aux modifications de prise alimentaire. En revanche, le by-pass Roux en Y (RYGB) réduit fortement la cholestérolémie, stimule significativement son élimination fécale en induisant le TICE et en réduisant l'absorption intestinale de cholestérol.

La seconde partie de ma thèse visait à répondre à une controverse autour de la faculté de l'intestin à sécréter PCSK9. *In vivo* (souris) et *ex vivo* (souris et homme), il ne semble pas que les cellules intestinales matures sécrètent PCSK9. En revanche, nous confirmons que la lignée humaine Caco2 est capable de sécréter PCSK9 mais que cette sécrétion est abolie lorsque les cellules deviennent matures. Les mécanismes responsables de cette perte de sécrétion restent mal définies mais sont dues au moins à deux paramètres: 1) une réduction du contenu intracellulaire induite par un catabolisme lysosomal accru; 2) une modification post-traductionnelle de PCSK9 (glycosilation) altérant les voies de sécrétion post-Golgiennes.

Les cellules Caco2 constituent un outil précieux pour disséquer les mécanismes et partenaires protéiques nécessaires à la sécrétion de PCSK9. Leurs identifications pourraient permettre de développer de nouveaux inhibiteurs pour réduire la sécrétion de PCSK9, réduire l'hypercholestérolémie et lutter plus efficacement contre les maladies cardiovasculaires.

Mots clés

Hypercholestérolémie ; Chirurgies bariatriques ; TICE ; PCSK9 ; Intestin ; Cholestérol ; Différenciation

Abstract

The intestine is a major actor of cholesterol metabolism from its role in absorption, secretion of lipoproteins and transintestinal cholesterol efflux (TICE). In addition, it is the second major organ, after the liver, to express the Proprotein Convertase Subtilisin Kexin type 9 (PCSK9), the natural inhibitor of the LDL receptor.

Our analysis of molecular mechanism involved in hypocholesterolemia induced by bariatric surgeries shows that the gastrectomy sleeve induces a transient and moderate hypocholesterolemia linked to the modification of the food intake. In contrast, the Roux-Y by-pass (RYGB) strongly reduces cholesterol, significantly stimulates its fecal elimination by inducing TICE and decreasing intestinal absorption of cholesterol.

The second part of my thesis consisted to elucidate the controversy around the faculty of the intestine to secrete PCSK9. *In vivo* (mice) and *ex vivo* (mice and human), it seems that mature enterocytes can't secrete PCSK9. On the other hand, we confirm that the Caco2, an human intestinal cell line, is capable of secreting PCSK9, but this secretion is abolished when the cells become mature. Mechanisms responsible for this loss of secretion remain poorly defined and are, at least, due to: 1) a reduction in the intracellular content induced by increased lysosomal catabolism; 2) a post-translational modification of PCSK9 (glycosilation) altering post-Golgi secretion pathways.

Caco2 cells are a powerful tool to identify the mechanisms and partners required for the secretion of PCSK9. Their identifiers allow the development of new inhibitors to reduce the secretion of PCSK9, reduce hypercholesterolemia and fight more effectively against cardiovascular diseases.

Key Words

Hypercholesterolemia ; Bariatric surgery ; TICE ; PCSK9 ; Small intestine ; Cholesterol ; Enterocyte differentiation